

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



Е.Н. Схолль-Энгбертс

2014 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ЛГ-Имаксиз (IMAXYZ))**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ЛГ-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке крови человека.

1.2. Лютеинизирующий гормон - пептидный гормон, секретируемый гонадотропными клетками передней доли гипофиза и имеющий молекулярный вес около 28 000 Да.

Белок имеет димерную структуру и состоит из 2 субъединиц α и β , соединённых двумя дисульфидными мостиками, к каждой из которых присоединены углеводные остатки. Альфа-субъединицы ЛГ, ФСГ, ТТГ и ХГЧ идентичны и состоят из 92 аминокислотных остатков. Биологическая активность гормонов определяется их бета-субъединицей, которая у ЛГ представлена 121 аминокислотой.

У женщин ЛГ стимулирует синтез эстрогенов; регулирует секрецию прогестерона и формирование жёлтого тела. Достижение критического уровня ЛГ приводит к овуляции и стимулирует синтез прогестерона в жёлтом теле. У мужчин, стимулируя образование глобулина, связывающего половые гормоны (ССГ), повышает проницаемость семенных канальцев для тестостерона. Тем самым увеличивается концентрация тестостерона в плазме крови, что способствует созреванию сперматозоидов. В свою очередь тестостерон повторно сдерживает выделение ЛГ. У мужчин уровень ЛГ увеличивается к 60 - 65 годам.

Выделение гормона носит пульсирующий характер и зависит у женщин от фазы овуляторного цикла. В пубертатном периоде уровень ЛГ повышается, приближаясь к значениям, характерным для взрослых. В менструальном цикле у женщин пик концентрации ЛГ приходится на

овуляцию, после которой уровень гормона падает и держится всю лютеиновую фазу на более низких, чем в фолликулярной фазе, значениях. Концентрация ЛГ в крови максимальна в промежуток от 12 до 24 часов перед овуляцией и удерживается в течение всего дня, достигая концентрации в 10 раз большей по сравнению с неовуляционным периодом.

Во время беременности концентрация ЛГ снижается. В период постменопаузы происходит повышение концентрации ЛГ, как и ФСГ.

У пациентов, страдающих от гипогонадизма обнаруживаются повышенные концентрации сывороточного ЛГ. Снижение синтеза стероидных гормонов у женщин в результате незрелости яичников, первичной недостаточности яичников, поликистоза яичников, или менопаузы, приводит к нерегулируемому образованию ЛГ. Аналогичное снижение выработки регуляторных гормонов у мужчин с аномалиями развития яичек так же приводит к росту концентрации ЛГ. Высокие концентрации ЛГ могут обнаруживаться при первичной тестикулярной недостаточности и синдроме Клайнфельтера. Однако, если образование андрогенов не нарушено, уровень ЛГ может не повышаться.

Увеличение концентрации ЛГ также обнаруживается при почечной недостаточности, циррозе печени, гипертиреозе, после сильного голодания.

Низкие уровни ЛГ могут привести к бесплодию как у мужчин, так и у женщин. Низкий уровень ЛГ может быть также связан с уменьшением секреции гонадолиберина в гипоталамусе, хотя тот же эффект наблюдается при отсутствии реакции передней доли гипофиза на стимуляцию гонадолиберинотом, т.е. низкие концентрации ЛГ могут указывать на нарушение функций гипоталамо-гипофизарной системы, что, однако, должно быть подтверждено дополнительными исследованиями.

В дифференциальной диагностике гипоталамо-гипофизарных или гонадных дисфункций, определение концентрации ЛГ необходимо проводить совместно с определением концентрации ФСГ, так как их роль в организме тесно взаимосвязана.

1.3. Набор «ЛГ-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензида (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно. Всего – 96 определений.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «ЛГ-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к ЛГ. Другие моноклональные антитела к ЛГ конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание ЛГ, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и взаимодействие связавшегося ЛГ с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой хрена. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к молекуле ЛГ, что позволяет использовать их для реализации одностадийного высокоспецифичного анализа.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими ЛГ. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ЛГ в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках проводится расчет концентрации ЛГ в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ

1 упаковка

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованными мышинными моноклональными антителами к ЛГ, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к ЛГ».

КОНЪЮГАТ

1 флакон, 14 мл

Конъюгат моноклональных антител к ЛГ с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Лиофилизированные или жидкости.

Аттестованы по стандарту 2nd IS 80/552, содержат известные количества ЛГ.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 0 мМЕ/мл ЛГ, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 3 мМЕ/мл ЛГ, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 12 мМЕ/мл ЛГ, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 24 мМЕ/мл ЛГ, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 60 мМЕ/мл ЛГ, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 120 мМЕ/мл ЛГ, маркирован «Калибровочная проба №6».

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон, 0,5 мл

Лиофилизированная или жидкость.

Маркирован «Контрольная сыворотка», содержит известное количество ЛГ, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

ПРИМЕЧАНИЕ: точные значения калибровочных проб и диапазон контрольной сыворотки указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

РАСТВОР ТМБ

1 флакон, 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон, 14 мл

1М соляная или 0,5М серная кислота, маркирован «Стоп-реагент».

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР.

1 флакон, 20 мл

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

Дополнительно в состав набора входят:

- пакет полиэтиленовый закрывающийся;
- пленка для заклеивания микропланшета.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ЛГ в сыворотке крови человека не превышает 0,2 мМЕ/мл.

4.2. Специфичность. Перекрестной реакции обоих моноклональных антител к ЛГ с фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), тиреотропным гормоном (ТТГ), гормоном роста человека и хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) не обнаружено.

4.3. Набор реагентов содержит специальные добавки, позволяющие исключить влияние на результаты анализа анти-мышинных антител (НАМА) и гетерофильных антител. Однако чрезвычайно высокие концентрации НАМА и гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

4.4. Линейность. Зависимость концентрации ЛГ в образцах сыворотки крови при разведении «Калибровочной пробой №1», имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

4.5. Точность. Соответствие измеренной концентрации ЛГ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.6. Коэффициент вариации результатов определения ЛГ в одном и том же образце с использованием набора «ЛГ-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.7. Клиническая проверка. Концентрация ЛГ была измерена в сыворотках крови 215 здоровых людей обоих полов (из них – 87 мужчин, 128 женщин). Результаты измерений приведены в таблице:

	Концентрация ЛГ мМЕ/мл
	Диапазон
Мужчины	1,1 – 8,5
Женщины:	
- фолликулярная фаза	1,6 – 12,6
- овуляторный пик	13 - 68
- лютеиновая фаза	0,9 – 16,2
- постменопауза	10,4 - 66

При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций ЛГ, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной *in vitro* диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, необходимо с калибраторами, контрольными материалами обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инаktivированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°C, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инаktivированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной или 0,5 М раствор серной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.8. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.
- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.
- Термостат или термостатируемый шейкер, позволяющий производить инкубацию при температуре +37°C без встряхивания.
- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.
- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизированной, мутной или гиперлипемичной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азидата натрия.

7.4. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение 24 часов с момента получения при условии их хранения при +2...8°C. Если тестирование откладывается более, чем на 24 часа, сыворотку следует

уделить от сгустка и хранить при +2...8°C не более 7 суток. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C. Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

8.2. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.3. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

Перед вскрытием флаконов ***с лиофилизированными калибровочными пробами и контрольной сывороткой*** легким постукиванием об поверхность стола стряхнуть частицы лиофилизованного порошка, прилипшие к стенкам флаконов и крышке.

Аккуратно открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл деионизованной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C). Аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. Выдержать флаконы еще 10 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

8.4. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера П развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Готовый к использованию Промывочный буфер хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся

использованным 20-кратный «Буфер П» хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности

8.5. Конъюгат анти-ЛГ-пероксидаза готов к использованию.

8.6. Раствор ТМБ готов к использованию.

8.7. Стоп-реагент готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H*	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата анти-ЛГ-пероксидаза.

9.3. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 25 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.*

9.4. Аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 1-2 минут.

9.5. Заклеить микропланшет специальной пленкой, входящей в состав набора.

9.6. Инкубировать стрипы в термостате в течение 1 часа при температуре +37°C без встряхивания.

9.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.4, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 1**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках А1 и А2 (контроль ТМБ)* и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

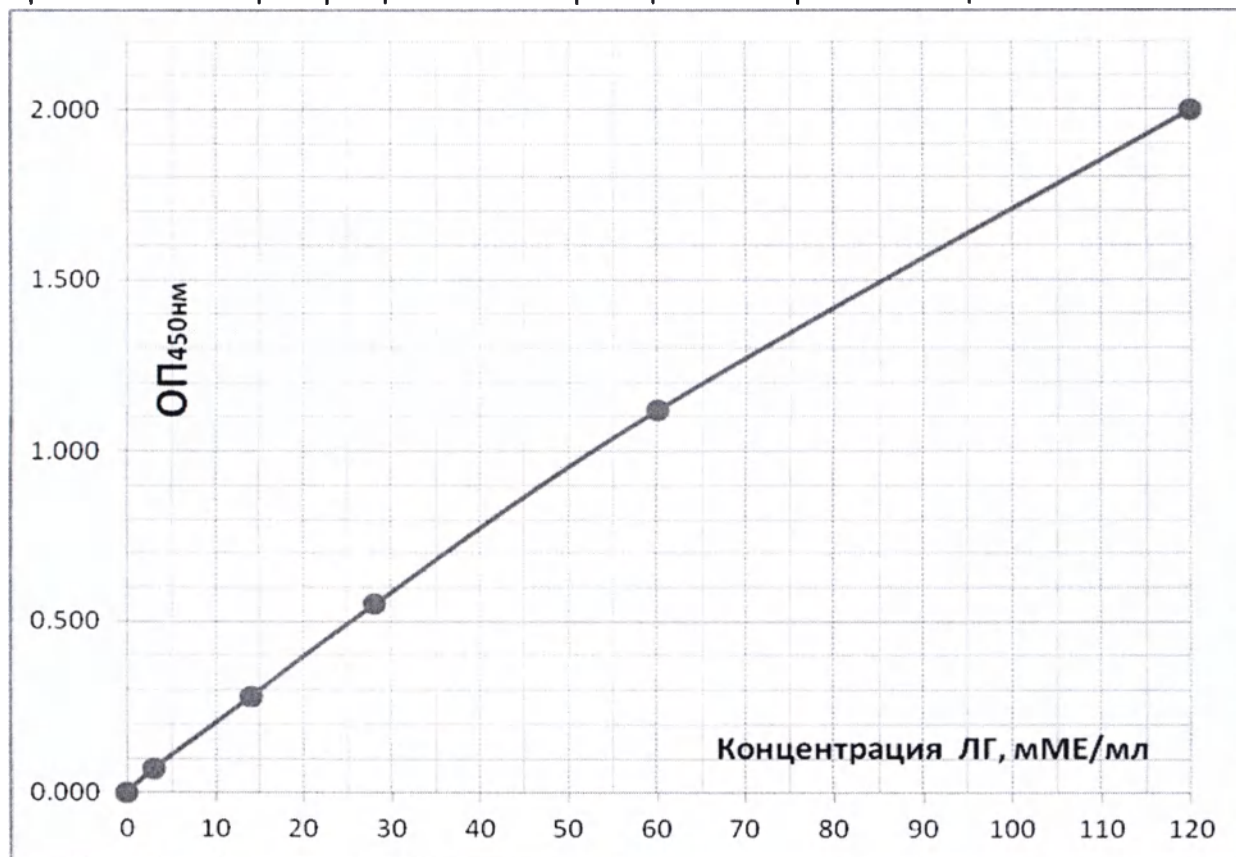
11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации ЛГ в калибровочных пробах (мМЕ/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. При наличии автоматической программы расчета на фотометре в качестве метода аппроксимации калибровочной кривой выбрать метод 4PL, 5PL или кубический сплайн.

11.4. Определить содержание ЛГ в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ЛГ умножить на фактор разведения.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них ЛГ. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации ЛГ в образцах сывороток пациентов:



12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре +2...8°C.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 18 месяцев. Не допускается использование серии набора по истечении срока ее годности.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- Калибровочные пробы, буфер для разведения образцов сыворотки крови и контрольную сыворотку после вскрытия и восстановления лиофилизатов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C. Для длительного хранения (в течение срока годности) заморозить при температуре ниже -20°C.
- «Буфер П» и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.
- Промывочный буфер, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C). Не добавлять в емкость с используемым промывочным буфером вновь приготовленный раствор.

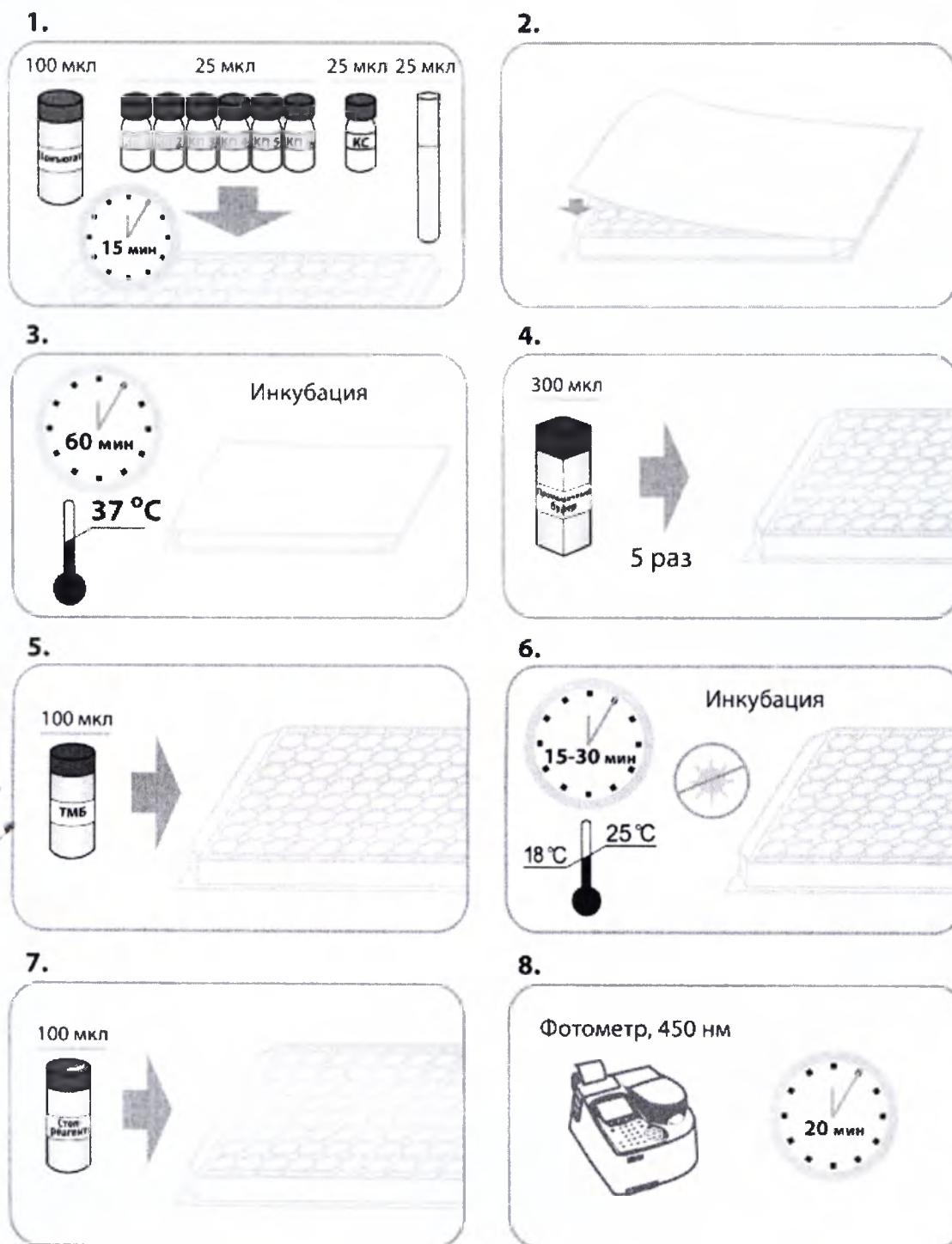
13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

14.1. Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г».

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 1.



-14-

ПРОШЕНО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«19» июн 20 14 год

Зав. кафедрой клинической
лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.

