

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



Е.Н. Схолль-Энгбертс
2014 г.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Фолликулостимулирующий гормон человека (ФСГ, фоллитропин) – гликопротеин с молекулярной массой около 30 000 Да, состоящий, так же, как лютеинизирующий гормон (ЛГ), хорионический гонадотропин человека (ХГч) и тиреотропный гормон (ТТГ), из 2 нековалентно связанных субъединиц – α и β .

α -субъединица ФСГ состоит из 92 аминокислот и очень схожа с α -субъединицей ЛГ, ХГч и ТТГ. β -субъединица ФСГ уникальна и именно она обуславливает его иммунологическую и функциональную специфичность.

ЛГ и ФСГ контролируют рост и репродуктивную активность гонадных тканей (яичников у женщин и семенников у мужчин). ФСГ стимулирует рост фолликулов в яичниках и гаметогенез в яичках у мужчин.

Гонадотропные клетки передней доли гипофиза секретируют ЛГ и ФСГ в ответ на стимуляцию гонадолиберинем, синтезируемым нейронами гипоталамуса. Уровень обоих гормонов контролируется стероидными гормонами по принципу отрицательной обратной связи с гипоталамусом.

ФСГ выбрасывается в кровь импульсами с интервалом в 1 – 4 часа и во время выброса концентрация ФСГ в крови в 1,5 – 2,5 раза

превышает его средний уровень. Уровень ФСГ в крови подвержен и сезонным колебаниям: у мужчин летом концентрация ФСГ выше, чем в другие времена года.

У женщин репродуктивного возраста ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов в яичниках, а его уровень изменяется в течение менструального цикла в ответ на изменения концентрации эстрогенов. Небольшой, но значимый рост концентрации ФСГ совпадает с волнообразным повышением ЛГ в середине цикла. Однако, физиологическое значение этого повышения неизвестно.

Уровень ФСГ снижается в лютеиновой фазе вместе со снижением секреции эстрадиола, а затем существенно возрастает в ответ на снижение ингибирующего воздействия на выработку гонадотропных гормонов.

У мужчин ЛГ, ФСГ и тестостерон регулируют сперматогенез в клетках Сертоли, находящихся в извитых канальцах семенников. Выработка ФСГ менее, чем ЛГ, подвержена ингибирующему воздействию андрогенов и, как предполагают, регулируется белком ингибином, продуцируемым так же в клетках Сертоли.

Поскольку выработка гонадотропных гормонов осуществляется по принципу отрицательной обратной связи, высокие концентрации ЛГ и ФСГ могут свидетельствовать о дисфункции гонадных тканей, особенно при сопутствующей низкой концентрации соответствующих гонадных стероидов.

У мужчин повышение уровня ФСГ может сигнализировать о первичной патологии яичек или анорхизме (их полном отсутствии). Уровень ФСГ может так же возрастать при синдроме Клайнфельтера (недоразвитие семенных канальцев) или при патологии клеток Сертоли.

У женщин повышенное содержание ФСГ при снижении концентрации гонадных стероидов наблюдается при менопаузе, ранней недостаточности яичников, при удалении яичников, в то время как при поликистозе яичников соотношение ЛГ к ФСГ может возрастать. Повышенные концентрации ФСГ могут так же свидетельствовать о нарушениях в гипоталамо-гипофизарной области. Использование оральных контрацептивов обычно приводит к снижению уровня гонадотропных гормонов из-за отрицательной обратной связи с этими стероидами.

У половозрелых людей, низкое содержание ФСГ, вместе с низким содержанием ЛГ и половых стероидных гормонов, может говорить о пангипопитуитаризме (синдроме Шиена). Это может быть результатом снижения выработки гонадолиберина или отсутствием ответа на стимуляцию гипофиза гонадолиберинот. Измерение уровня ФСГ с последующим измерением уровня гонадолиберина может помочь дифференцировать данные состояния.

1.3. Набор «ФСГ-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.

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

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «ФСГ-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к ФСГ. Другие моноклональные антитела к ФСГ конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание ФСГ, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и взаимодействие связавшегося ФСГ с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой хрена. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к β -субъединице ФСГ, 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 ФСГ. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ФСГ 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 ФСГ 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 ФСГ, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к ФСГ».

КОНЬЮГАТ

1 флакон, 14 мл

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

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Аттестованы по стандарту WHO IS 83/575, содержат известные количества ФСГ.

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

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

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

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

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

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

ПРИМЕЧАНИЕ: точные номиналы калибровочных проб указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон. 0.5 мл

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

РАСТВОР ТМБ

1 флакон, 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон, 14 мл

1М соляная кислота (HCl), 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 могут входить:

- защитная пленка для микропланшетов;
- пластиковые ванночки для реактивов;
- одноразовые наконечники;
- полиэтиленовый пакет с замком для хранения микропланшета.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

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

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

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

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

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

4.6. Клиническая проверка. Концентрация ФСГ была измерена в сыворотках крови 235 здоровых людей обоих полов в возрасте 21-60 лет (из них – 150 мужчин, 35 женщин в постменопаузе и 50 женщин с нормальным циклом).

	Концентрация ФСГ мМЕ/мл
	Диапазон
Мужчины	1.0 – 12
Женщины:	
- фолликулярная фаза	2.4 – 10
- овуляторный пик	4.2 – 20
- лютеиновая фаза	1.1 – 8.0
- постменопауза	25 – 130

При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций ФСГ, 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 инактивированы 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 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.

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

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 термостатирующий 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.

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

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азида натрия.

7.4. Если тестирование образцов откладывается более, чем на 24 часа, сыворотку следует отделить от кровяного сгустка, перенести в отдельную пробирку и хранить не более 72 часов при $+2...8^{\circ}\text{C}$. 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 ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

8.2. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) 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 $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

8.3. 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 ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток. Оставшийся

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

8.5. Конъюгат анти-ФСГ-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-ФСГ-пероксидаза.

9.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 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 в 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 20 – 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 ФСГ 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.

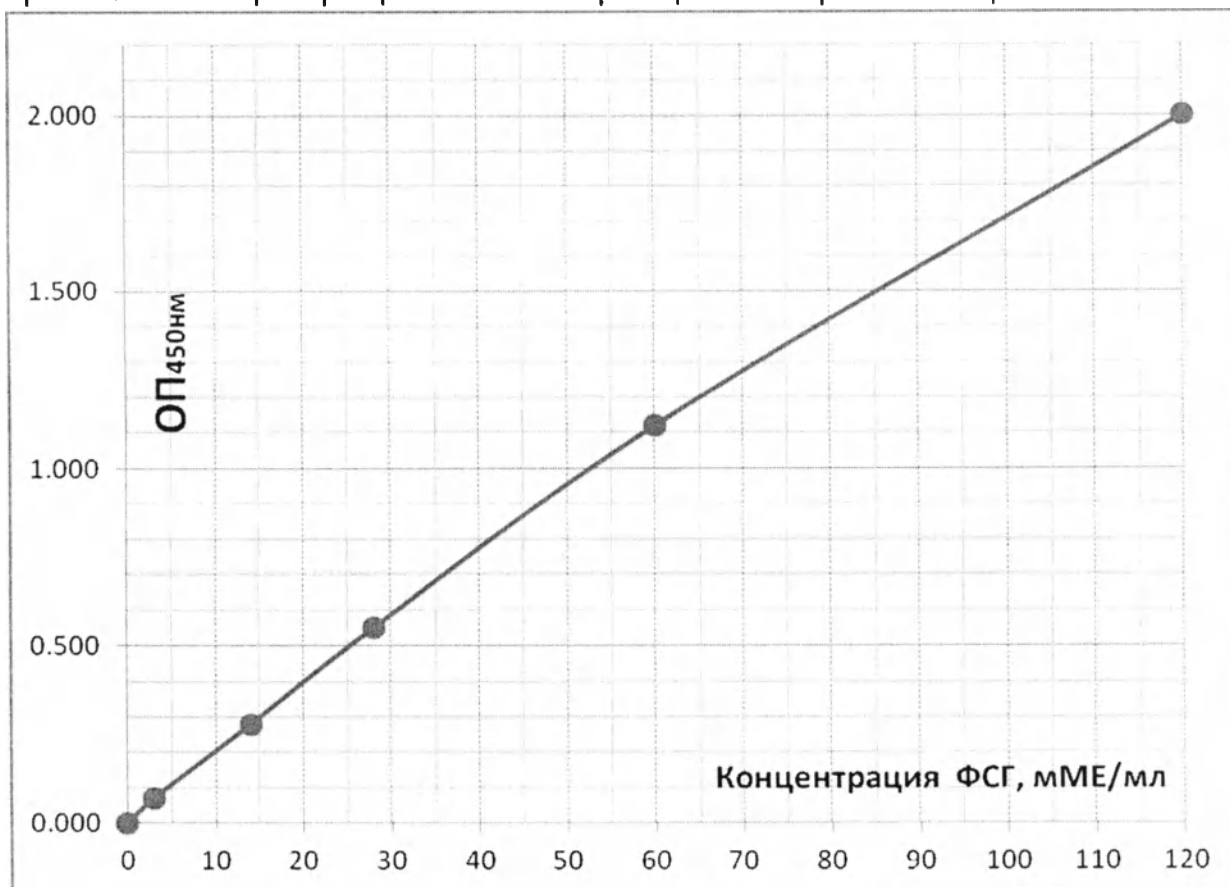
11.4. Определить содержание ФСГ в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов.

При необходимости пересчета полученных результатов в другие единицы измерения следует использовать формулы 1 и 2:

$$6 \text{ мМЕ/мл} = 1 \text{ нг/мл} \quad (1)$$

$$1 \text{ мМЕ/мл} = 1 \text{ МЕ/л} \quad (2)$$

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них ФСГ. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации ФСГ 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 настоятельно рекомендуется 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 набор 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, и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°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.

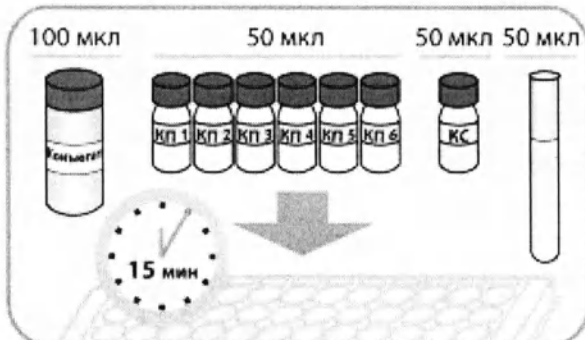
14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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».

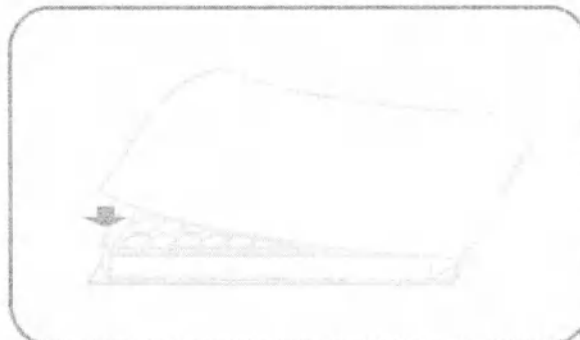
СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 1.

1.



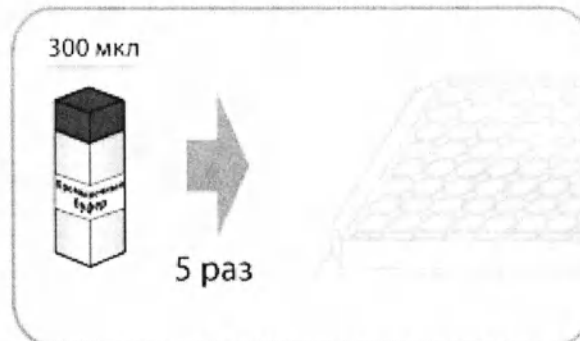
2.



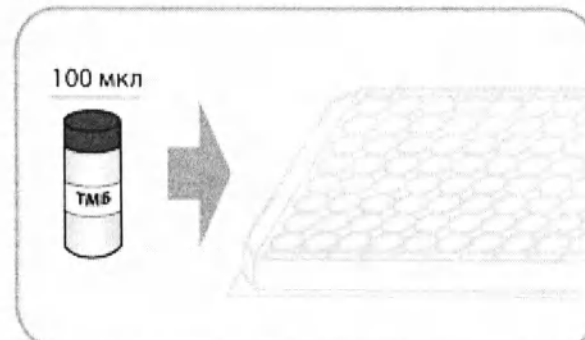
3.



4.



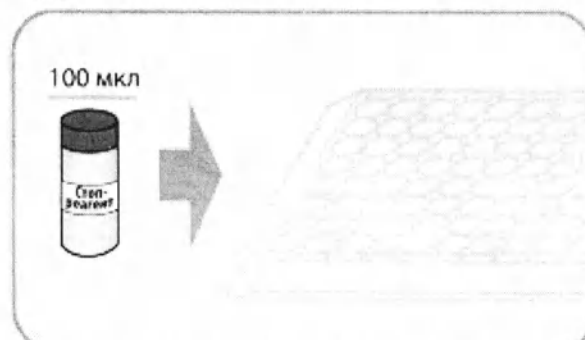
5.



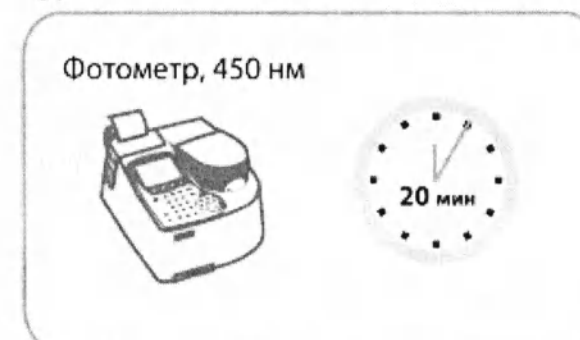
6.



7.



8.



ФСГ-Имаксиз (IMAXYZ) B2-09.13

По вопросам качества набора обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194156, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д. 27, корп. 38, лит. К, пом. 18,19, тел./факс (812)326-61-98 или на кафедру КЛД в ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России по адресу: 125 284, Москва, 2 Боткинский проезд, д.5. Телефон: +7 (495) 945-82-22.

Генеральный директор

ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



Е.Н. Схолль-Энгбертс.

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



Долгов В.В.

Прошито, пронумеровано,
и скреплено печатью

Всего

14 листа(ов)

Ген. директор

Схолль-Энгбертс Е.Н.

