

УТВЕРЖДЕНА

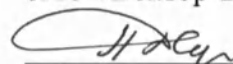
Приказом Росздравнадзора

от _____ 2012 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови

(ФСГ-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ФСГ-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ФСГ – гликопротеин с молекулярной массой около 30 кДа, состоящий из двух ковалентно связанных субъединиц. Лютеинизирующий (ЛГ), тиреотропный гормоны (ТТГ), хорионический гонадотропин (ХГЧ) и ФСГ имеют идентичную по своей структуре α -субъединицу, которая не обладает гормональной активностью. Специфический биологический эффект определяется β -субъединицей. ФСГ синтезируется базофильными клетками передней доли гипофиза.

У женщин репродуктивного возраста ФСГ, совместно с ЛГ, определяет развитие нормального менструального цикла.

У мужчин в пубертатном периоде ФСГ является основным стимулятором роста семявыносящих канальцев.

1.3. Количественное определение содержания ФСГ в сыворотке крови может быть использовано для оценки гормонального статуса, диагностики и контроля эффективности терапии нарушений репродуктивной функции, бесплодия.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и м.н.с. Н.А. Штейгер.

Наряду с пролактином и ЛГ, определение ФСГ является первым этапом исследований нарушений менструального цикла и позволяет проводить дифференциальную диагностику центральных и периферических форм заболеваний репродуктивной системы. У мужчин сывороточный уровень ФСГ используется как маркер активности сперматогенеза. Определение его содержания может быть полезно при первичном скрининге в обследовании на мужское бесплодие.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных, 1 контрольного образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к ФСГ. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител с пероксидазой во время инкубации одновременно происходит связывание ФСГ с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой.

Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окрашивания прямо пропорциональна концентрации ФСГ в анализируемых образцах. Концентрацию ФСГ в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания ФСГ в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ФСГ; готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по Первому международному стандарту FSH NIBSC 83/575, содержащие известные количества ФСГ – 0; 5; 10; 25; 50; 100 мМЕ/мл; концентрации ФСГ в калибровочных образцах могут отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,5 мл)
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ФСГ; готовый для использования – 1 флакон (0,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к ФСГ с пероксидазой хрена; готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс); готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент; готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 1 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5–200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции используемых моноклональных антител к ФСГ с хорионическим гонадотропином, лютеинизирующим и тиреотропным гормонами.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ФСГ в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ФСГ-ИФА-БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ФСГ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ФСГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-100 мМЕ/мл и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ФСГ предписанной в образце, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 10 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ФСГ не превышает 0,5 мМЕ/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация ФСГ, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч в юго-восточном регионе Западной Сибири, у 53 здоровых мужчин в возрасте 20-42 лет находилась в пределах от 1 до 10,5 мМЕ/мл; у 148 здоровых женщин в возрасте 18-36 лет в различных фазах менструального цикла концентрация ФСГ находилась в пределах: фолликулярная фаза – от 2 до 10 мМЕ/мл; овуляция – от 5 до 20 мМЕ/мл; лютеиновая фаза – от 1,3 до 10 мМЕ/мл; у 22 женщин в возрасте 50-69 лет в постменопаузе концентрация ФСГ находилась в пределах от 20 до 130 мМЕ/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ФСГ, соответствующие нормальным для данного региона, у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в

двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм – 655 нм;

- термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при 400-800 об/мин и при температуре 37 ± 1 °С;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости от 5 до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из

его воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные образцы и контрольный образец готовы к использованию.

Перед использованием встряхнуть.

Калибровочные образцы и контрольный образец после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.4. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.5. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Конъюгат после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

7.8. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл каждого калибровочного образца и по 25 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15 мин.

7.9. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при 650 об/мин и температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.4). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации ФСГ в калибровочных образцах (мМЕ/мл).

9.2. Определить концентрацию ФСГ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов «ФСГ-ИФА-БЕСТ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец и конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- раствор ТМБ плюс, 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ФСГ в контрольном образце.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «ФСГ-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 363-20-60, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Зав. лабораторией НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

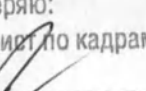
Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

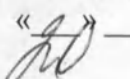
«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



Подпись 
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись 
" " 20__ года

д.м.н., профессор В.В. Долгов

 20__ г.

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
листов

