

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

П.Г. Каленик

набор 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения фолликулостимулирующего гормона (FSH)
производства фирмы HUMAN GmbH (Германия)**

Фолликулостимулирующий гормон (FSH)

Иммуноферментный тест для количественного определения фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) представляет собой гликопротеин с молекулярным весом около 35500 дальтон, который синтезируется передней долей гипофиза. ФСГ стимулирует созревание фолликулов яичников и усиливает выделение эстрогенов, у мужчин гормон стимулирует интерстициальные клетки половых желез и сперматогенез. Содержание ФСГ зависит от фазы менструального цикла. Хотя уровень ФСГ снижается в фолликулиновую стадию, пик концентрации наблюдается перед овуляцией, в середине цикла. Было доказано клиническое и диагностическое значение измерения уровня ФСГ для оценки функциональной активности оси гипоталамус-гипофиз-гонады, регулирующей репродуктивную систему организма.

ПРИНЦИП МЕТОДА

ФСГ иммуноферментный тест фирмы HUMAN основан на классическом «сэндвич» методе ИФА 2-го поколения. В нем используется высокоаффинная система биотин-стрептавидин. На лунках микропланшета адсорбирован стрептавидин. При первой инкубации образцы сыворотки, калибраторы или контроли, конъюгат (меченые пероксидазой антитела к ФСГ), а также биотинилированные моноклональные антитела к ФСГ смешиваются друг с другом, образуя при этом структуру типа «сэндвич», связанную с поверхностью лунок за счет взаимодействия биотина с иммобилизованным стрептавидином. После инкубации не связавшийся конъюгат и моноклональные антитела удаляются промывкой. Добавление в лунки субстрата (2 стадия) приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет на желтый при добавлении стоп-реагента, вносимого для остановки реакции. Интенсивность окраски измеряется фотометрически и пропорциональна концентрации ФСГ в пробе.

Измерение оптической плотности калибраторов и образцов проводят на планшетном фотометре (например, HUMAREADER или ELISYS, Human). Численное значение концентрации определяется с помощью калибровочной кривой, построенной по калибраторам, входящим в состав набора.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Набор содержит реагенты, достаточные для выполнения 96 определений:

MIC	Стрипы 8-луночные (в рамке-держателе) Стрипы, разделяемые на отдельные лунки, покрытые стрептавидином	12
CAL	Калибраторы (A - F) (белая крышка) Готовы к использованию; человеческие сыворотки, содержащие ФСГ в концентрациях 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) и 100 (F) Международных единиц ФСГ (МЕ)/л	6×2,0 мл
CON	Конъюгат (белая крышка) Готовый к использованию, <u>зеленого цвета</u> , содержит антитела козы к ФСГ, меченые пероксидазой хрена, и биотинилированные моноклональные мышиные антитела к ФСГ в концентрации 1,0 мкг/мл; pH 7,45±0,1	1×13 мл
WS	Промывочный раствор (черная крышка) Концентрат MOPS-солевого буфера (на 1000 мл готового раствора), 5 ммоль/л; pH 8,8±0,4	1×20 мл
SA	Субстратный реагент А (желтая крышка) Ацетатный буфер (0,05 моль/л ацетата натрия), содержащий 4 ммоль/л 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ); pH 3,5±0,1	1×7,0 мл
SB	Субстратный реагент В (синяя крышка) Ацетатный буфер (0,05 моль/л ацетата натрия), содержащий 10 ммоль/л комплекса мочевины с перекисью водорода; pH 4,5±0,1	1×7,0 мл
STOP	Стоп-реагент (красная крышка) Серная кислота 0,5 моль/л	1×7,5 мл
	Пленка для заклейки стрипов	1

- Общее содержание консервантов в реагентах < 0,04%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не пипетируйте реагенты ртом, не курите, не принимайте пищи во время исследования.
2. Избегайте контакта реагентов и проб с кожей и слизистыми.
3. Пользуйтесь специальной одеждой и одноразовыми перчатками.
4. Обращайтесь с калибраторами CAL и пробами, как с материалами, несущими инфекционную опасность.
5. Калибраторы CAL, входящие в состав набора, проверены на отсутствие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, а также HBs-антигена, тем не менее, обращаться с ними надлежит, как с несущими потенциальную инфекционную опасность.
6. После исследования все материалы, контактировавшие с исследуемыми пробами или калибраторами, должны быть подвергнуты дезактивации автоклавированием в течение 1 часа при температуре 121 °С, или замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 1 часа.
7. Стоп-реагент STOP содержит соляную кислоту, способную вызвать ожоги глаз и кожи. При попадании его на кожный покров и слизистые тщательно промойте их большим количеством проточной воды, после чего обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты сохраняют стабильность при хранении 2-8 °С до указанного на флаконах срока годности.

После вскрытия все реагенты и стрипы следует использовать в течение 60 дней (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Стрипы MIC

Стрипы запаены в пластиковый металлизированный пакет с влагопоглотителем.

Перед вскрытием упаковки стрипы должны быть доведены до комнатной температуры во избежание конденсации влаги внутри лунок.

После вскрытия вакуумной упаковки остающиеся стрипы вернуть в пакет с влагопоглотителем и плотно закрыть его имеющейся на пакете самоуплотняющейся застежкой. Хранящиеся в таком виде при температуре 2...8 °С стрипы остаются пригодными к использованию до истечения срока годности (см. также раздел ПРИМЕЧАНИЕ).

Не трогайте руками дно лунок с наружной стороны и их верхние грани.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ПРОБ

Перед использованием все реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °C). Не используемые реагенты должны храниться при температуре 2...8 °C.

Промывочный раствор WASH

- Легкое помутнение, которое может появиться в концентрате WS при хранении, полностью исчезает после разведения и не влияет на результаты анализа.
- Для получения рабочего раствора промывочного буфера разведите концентрат WS свежей деионизированной водой до объема 1000 мл в подходящей посуде (остатки концентрата смойте из флакона несколькими порциями воды).
- Стабильность: в течение 60 дней при 15-25 °C.

Рабочий раствор субстрата SUB

- Для длительного использования: приготовьте необходимое количество раствора смешиванием равных объемов субстратного реагента SA и субстратного реагента SB. Используйте только чистую пластиковую посуду, предварительно ополоснутую деионизированной водой.
- Для использования в течение 30 дней: Перелейте содержимое флакона с субстратным реагентом SA во флакон с субстратным реагентом SB, перемешайте и храните при 2...8 °C.
- Работайте с рабочим раствором субстрата SUB аккуратно и избегайте контаминации! Не используйте раствор, если он приобрел голубую окраску!
- Храните рабочий раствор в защищенном от света месте.
- Стабильность: 30 дней при 2...8 °C.

Исследуемые пробы

Сыворотка крови.

Не используйте образцы с гемолизом или гиперлипемией.

Пробы могут храниться до 5 дней при температуре 2...8 °C, или до 30 дней при температуре -20 °C.

Допускается только однократное замораживание. После размораживания пробы необходимо гомогенизировать. Видимые включения следует удалить центрифугированием или фильтрацией.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Внимание! Точность полученных результатов зависит от строгого следования приведенной ниже процедуре исследования.

Предварительные замечания

P1: Не смешивайте реагенты из разных партий наборов. Не путайте крышки от флаконов (риск контаминации). Не пользуйтесь просроченными реагентами.

P2: Не пользуйтесь реагентами, если они загрязнены, либо имеют запах или вид, отличный от обычного.

P3: Аккуратно впишите номера калибраторов CAL, контролей и проб в листок-формуляр, приложенный к оригиналу инструкции.

P4: Подсчитайте количество лунок, необходимое для данного исследования. Выньте необходимое количество стрипов MIC или отдельных лунок из упаковки и вставьте их в рамку-держатель.

P5: Исследование калибраторов CAL, контролей и проб должно проводиться в дубликатах. Вносить пробы и калибраторы CAL необходимо как можно ближе ко дну лунки.

P6: Всегда вносите реагенты в лунки в одном и том же порядке, чтобы свести к минимуму разброс по времени реакции между отдельными лунками. Это важно для воспроизводимости результатов. Общее время пипетирования не должно превышать 10 минут. В противном случае, калибраторы следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой половины проб. Если для анализа используется больше одного микропланшета, калибровку следует выполнить на каждом из них.

P7: Любые воздушные пузырьки в лунках должны быть удалены до начала инкубации или измерения оптической плотности.

P8: Добавление рабочего раствора субстрата SUB инициирует процесс развития окраски, который прерывается при добавлении стоп-реагента STOP. Во время развития окраски предохраняйте ячейки от попадания яркого света.

P9: После каждого пипетирования необходимо аккуратно перемешивать содержимое лунок в течение 20-30 секунд, избегая переноса жидкости из лунки в лунку. При возможности используйте шейкер для микропланшетов.

Методика промывки

Промывка лунок является исключительно важной стадией. Недостаточная промывка ведет к снижению точности полученных результатов и завышению оптической плотности.

W1: Снимите со стрипов защитную пленку, после чего удалите жидкость из лунок и внесите в них промывочный раствор WASH. Через 30 секунд удалите жидкость из лунок и повторите промывку дважды.

W2: При использовании автоматического промывочного устройства заправьте его промывочным раствором и промойте лунки 3 раза. Следите за тем, чтобы вошер целиком заполнял ячейки жидкостью и полностью удалял ее через каждые 30 секунд (остаток жидкости не должен превышать 15 мкл).

W3: После окончания промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым микропланшетом (стрипом) о фильтровальную бумагу.

Схема проведения анализа

Перед использованием все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры.

Стадия 1	Внесите в лунки:	Лунка [объем жидкости в мкл]	
		A1...D2 Калибраторы	E2... Образцы
CAL A – F; каждый в две лунки (дубликаты)		50	--
Образцы, контроли; каждый в две лунки (дубликаты)		--	50
Конъюгат CON во все лунки		100	100
Перемешайте и закройте стрипы MIC клейкой пленкой			
Инкубируйте 60 минут при 20-25 °С.			
Промойте лунки 3 раза, как описано (см. W1-W3).			
Рабочий раствор промывочного буфера WASH		300	300
Стадия 2	Внесите в лунки:		
Рабочий раствор субстрата SUB		100	100
Инкубируйте 15 минут при 20-25°С в темноте (см. P8).			
Добавьте стоп-реагент STOP		50	50
Тщательно перемешайте.			
После добавления стоп-реагента как можно быстрее (в течение не более чем 10 минут) измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя (по возможности) референтную длину волны 630-690 нм.			

ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

Максимальная оптическая плотность $ОП_{max}$ (калибратор CAL F) $\geq 1,5$

Концентрация ФСГ при 80% $ОП_{max}$ = 75 ± 20 МЕ/л

Концентрация ФСГ при 50% $ОП_{max}$ = 40 ± 10 МЕ/л

Концентрация ФСГ при 20% $ОП_{max}$ = 15 ± 5 МЕ/л

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения концентрации ФСГ по измеренной оптической плотности строится калибровочная кривая.

1. Постройте на миллиметровой бумаге калибровочный график, откладывая по оси абсцисс (X) концентрации ФСГ калибраторов CAL, а по оси ординат (Y) – соответствующие им дубликаты значений оптической плотности. Дубликаты перед нанесением не усреднять.
2. Соедините точки на графике плавной линией.
3. Для определения неизвестной концентрации ФСГ в пробе отложите на оси Y среднее для дубликата значение оптической плотности и проведите горизонтальную прямую до пересечения с калибровочной кривой. Вертикальная линия, проведенная из точки пересечения до оси X, укажет значение концентрации ФСГ в пробе. Дубликаты значений оптической плотности для проб с неизвестной концентрацией можно предварительно усреднить. В качестве иллюстрации см. график в английском варианте инструкции.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание ФСГ зависит, кроме гипоталамического гомеостаза, от множества других факторов. В связи с этим одно только определение ФСГ не достаточно для оценки клинического статуса.

Секреция ФСГ подавляется эстрогенами, однако у женщин, принимающих оральные контрацептивы, уровень ФСГ может быть нормальным.

Строгая диета и потеря веса могут вести к снижению уровня ФСГ в крови.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровни ФСГ при нормальном менструальном цикле:

Фаза цикла	ФСГ (МЕ/л)
Фолликулиновая фаза	3,0 – 12,0
Середина цикла	8,0 – 22,0
Лютеиновая фаза	2,0 – 12,0
Постменопауза	35,0 – 151

Значения ФСГ для мужчин лежат в диапазоне 1,0 – 14,0 МЕ/л.

Каждой лаборатории следует устанавливать собственные диапазоны ожидаемых значений, учитывающие применяемые в ней способы взятия крови, используемые приборы и методы анализа.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ФСГ иммуноферментный тест фирмы HUMAN имеет чувствительность около 0,8 МЕ/л.

Пробы с концентрацией ФСГ выше 100 МЕ/л рекомендуется развести CAL A (0 МЕ/л) в соотношении 25 мкл пробы на 25 мкл CAL A и исследовать повторно. Полученный при этом результат умножьте на 2.

Набор стандартизирован по 2-му Международному стандарту ВОЗ 78/549.

Сведения об аналитических характеристиках ИФА теста ФСГ фирмы HUMAN можно найти в Отчете об испытаниях, опубликованном в Интернете на сайтах:

<http://www.human.de/data/gb/vr/ef-fsh.pdf>

или

<http://www.human-de.com/data/gb/vr/ef-fsh.pdf>

ПРИМЕЧАНИЕ

Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

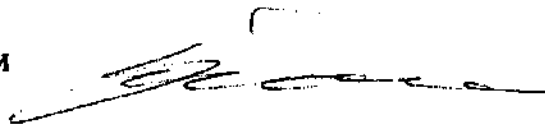
Компоненты набора пригодны к использованию до окончания срока хранения, указанного на упаковке, даже после вскрытия их упаковки. Тем не менее, контаминация реагента зависит от количества отборов реагентов. 60-дневный срок использования реагентов установлен из соображения надежности получения результатов.

При работе с набором следует обеспечить постоянное соблюдение основных требований GLP (надлежащей лабораторной практики).

Данные требования в т.ч. включают: необходимость плотно закрывать флаконы немедленно после отбора реагентов; не возвращать во флакон отобранный реагент, если он соприкасался с поверхностями или другими растворами, способными вызвать контаминацию; как можно быстрее возвращать реагенты в стандартные условия хранения (2...8 °C).

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 5 листов.

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ЗАО «АНАЛИТИКА»
КАЛЕНИК П. Г.

