

Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп. 3
Факс (017) 211-80-19

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИРМА-ФСГ-СТ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ А.С. Романенков
"30" 03 2005 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-ФСГ-СТ предназначен для определения концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке или плазме крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только "in vitro".

1.2 ФСГ является гликопротеином с молекулярной массой 30 кДа, который секретируется передней долей гипофиза. Он состоит из двух нековалентно связанных субъединиц - альфа и бета. Альфа-субъединица ФСГ является общей и для других гликопротеидных гормонов гипофиза: тиреотропного гормона (ТТГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ). Бета-субъединица определяет биологическую и иммунологическую специфичность гормона, что позволяет отличить ФСГ от других гликопротеидных гормонов. У женщин ФСГ совместно с ЛГ стимулирует овуляцию и образование желтого тела. Уровень ФСГ регулирует циклические изменения секреции половых стероидов, концентрация которых постепенно увеличивается во время созревания фолликула в первой части цикла, а также отвечает за пик секреции и овуляцию. У мужчин ФСГ совместно с ЛГ и тестостероном стимулирует сперматогенез. Во время пубертатного периода под воздействием ФСГ клетки Лейдига приобретают способность отвечать на ЛГ продукцией тестостерона.

Изменения концентрации ФСГ в сыворотке (плазме) крови пациентов могут быть использованы при исследовании аномалий полового развития, причин бесплодия и нарушений менструально-го цикла.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-моноклональные антитела к ФСГ, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон; 5,5 мл;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ФСГ, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы ФСГ, в диапазоне концентраций (0-200) МЕ/л (точные значения концентраций ФСГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, 7 флаконов по 1 мл. Калибровочные пробы ФСГ откалиброваны относительно международного стандарта 2 IRP MRC 78/549;
- концентрат промывочного раствора, 1 флакон, 25 мл;
- контрольная сыворотка (КС) - лиофилизированный препарат, содержащий известное количество ФСГ, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, 7 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 3 ч. Диапазон определяемых концентраций ФСГ - (0,5-200) МЕ/л.

2.4 Принцип работы набора заключается в следующем. Иммунорадиометрическое определение ФСГ относится к анализам типа "сэндвич". В наборе используется два вида мышиных моно-

клональных антител к различным эпитопам его молекулы. Исследуемые образцы, контрольные и калибровочные пробы инкубируют в пробирках, покрытых одним видом моноклональных антител, совместно с раствором других моноклональных антител, меченых [¹²⁵I]. После окончания инкубации удаляют жидкое содержимое, промывают пробирки и измеряют связанную активность [¹²⁵I]. Концентрацию ФСГ, прямо пропорциональную связанной активности, определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [¹²⁵I]-моноклональные антитела к ФСГ являются источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [¹²⁵I] - 60,1 сут.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) по 3-му классу работ (Нормы радиационной безопасности НРБ-2000 и основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности ОСП-2002).

ВНИМАНИЕ! Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

3.3 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита или другие вирусные инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности, предусмотренных приказами МЗ РБ № 66 и № 351.

3.5 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- водоструйный насос типа KM-1230;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,1 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- стакан химический или колба плоскодонная вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические резиновые.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1 Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Внести в колбу плоскодонную вместимостью 500 мл с помощью мерного стакана 475 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Разбавленный промывочный раствор может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.3 Во флакон, содержащий КС, внести 1,0 мл дистиллированной воды. Через 30 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

КС можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 24 ч. При необходимости более длительного хранения, КС разделить на несколько аликвот и заморозить при температуре не менее минус 20 °С. Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к ФСГ маркируют следующим образом (в дубликатах): В₀-В₆ - калибровочные пробы ФСГ; В_{КС} - контрольная сыворотка; В_Х - исследуемые пробы сыворотки или плазмы крови;

6.2 В пробирки В₀-В₆ внести по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки В_{КС} внести по 0,1 мл (100 мкл) КС. В пробирки В_Х внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых сывороток или плазмы крови.

6.3 Во все пробирки внести по 0,05 мл (50 мкл) [¹²⁵I]-моноклональных антител к ФСГ.

6.4 Инкубировать все пробирки в течение 1,5 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянным встряхиванием на приборе для встряхивания пробирок (не менее 350 встряхиваний в мин).

6.5 После окончания инкубации аккуратно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

6.6 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (см.п.5.2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки. После промывки в пробирках не должно оставаться следов окрашенной жидкости.

6.7 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

6.8 Последовательность внесения реагентов в пробирки и проведение других операций анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций		
	Калибровочные пробы, контрольная и исследуемые сыворотки, мл	[¹²⁵ I]-моноклональные антитела к ФСГ, мл	Содержимое пробирок тщательно перемешать. Инкубировать в течение 1,5 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании
V ₀ -V ₆	0,100	0,050	
V _{КС}	0,100	0,050	
V _Х	0,100	0,050	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса.	Повторить стадию промывки.
V ₀ -V ₆		2		
V _{КС}		2		
V _Х		2		

Измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок и рассчитать величину V_i/V₀, в единицах относительной скорости счета, для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки, где V_i – среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках V₁-V₆, V_{КС} или V_Х.

7.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения V_i/V₀, в единицах относительной скорости счета, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций ФСГ, в МЕ/л, в соответствующих калибровочных пробах.

Определить по калибровочной кривой концентрацию ФСГ в контрольной и исследуемых сыворотках или плазме крови.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Чувствительность

Минимальная концентрация ФСГ, определяемая с помощью набора, составляет 0,5 МЕ/л.

8.2 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации ФСГ в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием ФСГ не превышает 8%.

8.3 Тест на "открытие"

Процент "открытия" ФСГ, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ФСГ, составляет 80-120%.

8.4 Клиническая проверка набора

При клинических испытаниях набора получены следующие диапазоны концентраций ФСГ в сыворотке крови:

Мужчины		1,5- 7	МЕ/л
Женщины:	фолликулярная фаза	1,8-10,5	МЕ/л
	предовуляторный пик	4,5-18	МЕ/л
	лютеиновая фаза	1,5- 6	МЕ/л
	менопауза	> 30	МЕ/л
Препубертатные дети		< 1	МЕ/л

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Компоненты набора должны храниться при температуре (2 – 8) °С в течение всего срока годности набора.

9.2 Определение концентрации ФСГ с помощью набора ИРМА-ФСГ-СТ проводят в сыворотке или плазме крови человека. Плазму крови получают с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА.

Образцы сыворотки или плазмы крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Образцы сыворотки или плазмы крови можно хранить при температуре не менее минус 20 °С в течение более длительного

времени – не более 3 месяцев (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

9.3 Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

9.4 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

9.5 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций ФСГ, соответствующие нормальным.