

**НАБОР ЧФСГ [I-125] IRMA**

(Номер по каталогу: RK-790CT)

Система <sup>125</sup>I-чФСГ IRMA позволяет проводить прямое количественное определение человеческого фолликулостимулирующего гормона (чФСГ) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение чФСГ может проводиться в диапазоне 0-150 мМЕ/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 100 мкл.

**Введение**

Фолликулостимулирующий гормон (фоллитропин или чФСГ) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 30000, секретируемый аденогипофизом. Как и другие гликопротеиновые гормоны (ЛГ, ТСГ и ГКГ), чФСГ содержит две различные субъединицы, α-и β-цепь, связанные нековалентно. Первичные структуры α субъединиц чФСГ и вышеуказанных гормонов практически идентичны, в то время как их β-субъединицы различны. β-субъединицы ответственны за иммунологическую и биологическую специфичность этих гормонов. Синтез и высвобождение чФСГ стимулируются гонадотропин-релизинг гормоном (ГнРГ) гипоталамуса, тогда как стероиды яичников, секретируемые желтым телом, контролируют дальнейшую секрецию чФСГ по принципу отрицательной обратной связи. Измерение концентрации чФСГ является важной частью исследований нарушений в системе гипоталамус - гипофиз - половые железы. Для того, чтобы дифференцировать дисфункцию гипоталамуса и гипофиза рекомендуется определить значение обоих гормонов чФСГ и чЛГ.

**Принцип метода**

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченое <sup>125</sup>I, связывается с эпитопом молекулы ФСГ, которая отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело – антиген – сигнальное антитело, также известного как "сэндвич".

В течение 1 часового инкубационного периода при непрерывном помешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционную смесь извлекают, пробирки тщательно промываются, и производится замер их радиоактивности в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество чФСГ, может быть определена искомая концентрация чФСГ в образцах пациента.

**Содержание набора**

- 1 флакон (21 мл) МЕТКИ, готовой к использованию. Содержит около 740 кБк <sup>125</sup>I-анти-чФСГ и иммобилизованные анти-чФСГ в буфере с красным красителем и 0.1 % NaN<sub>3</sub>.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (6 x 1.0 мл), (S1-S6). Точная концентрация указана на каждом флаконе (откалиброваны по ВОЗ 92/510 Int.Std.), в сыворотке бычьей крови с 0.1% NaN<sub>3</sub>. См. *Приготовление реактивов*
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ. Лиофилизированная сыворотка крови человека с 0,1% NaN<sub>3</sub>. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества. См. *Приготовление реактивов*.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2X50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованные в пластиковые коробки.
- 1 флакон (20 мл) КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА, с 0.2% NaN<sub>3</sub>. См. *Приготовление реактивов*.

Сертификат качества  
Листок-вкладыш

**Необходимые материалы, инструменты и оборудование**

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (100, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревая мешалка, шейкер, полимерная пленка абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

**Рекомендуемые инструменты и оборудование**

автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром 1л (вместо 2мл пипетки).

**Сбор и хранение образцов**

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (- 20 °С). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Образцы сыворотки с концентрацией чФСГ выше, чем в самом концентрированном стандарте, следует разбавить и проанализировать еще раз.

**Приготовление реактивов, хранение**

Для получения 720 мл промывочного раствора добавьте 20 мл концентрата промывочного буфера к 700 мл дистиллированной воды. Готовый раствор хранить при температуре 2-8 °С до окончания срока годности НАБОРА.

Добавьте к лиофилизированной контрольной сыворотке 1000 мкл дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте встряхиванием или взбалтыванием (следует избегать образования пены).

Убедитесь, что достигнуто полное растворение и дайте раствору уравниваться при комнатной температуре в течение 20 минут. Хранить при температуре -20 °С до окончания срока годности НАБОРА.

Открытые образцы следует хранить при температуре 2-8 °С. При такой температуре каждый реактив стабилен до окончания срока годности НАБОРА. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

**ВНИМАНИЕ!**

Уравновесьте все реагенты и образцы сыворотки до комнатной температуры. Тщательно смешайте все реактивы и образцы перед использованием. Избегайте чрезмерного пенообразования.

**Процедура количественного определения**

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта (S1-S6), контрольной сыворотки и образцов.
3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы аккуратным перемешиванием, избегая вспенивания.
4. С помощью пипетки поместите по 100 мкл стандартов, контрольной сыворотки и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Используйте штатив для фиксации пробирок. Не дотрагивайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 200 мкл метки.
6. Закройте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и настройте скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
7. Инкубируйте пробирки на шейкере в течение 1 часа при комнатной температуре.

8. В каждую пробирку добавьте 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.
9. Верните штатив в исходное положение и повторите шаг 8 еще один раз.
10. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
11. Рассчитайте концентрацию чФСГ в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов» или используйте для этого специальное программное обеспечение.

**Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения с помощью пипетки (все объемы представлены в микролитрах)**

Пробирки	Всего	Стандарт	Контрольный образец	Образец
Стандарт		100		
Контрольный образец			100	
Образец				100
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Измерьте уровень радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

### Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2. Рассчитайте среднее значение в минуту (СРМ) для каждой пары исследуемых пробирок. Рассчитать нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$B/T(\%) = \frac{S_{2.6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_1 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

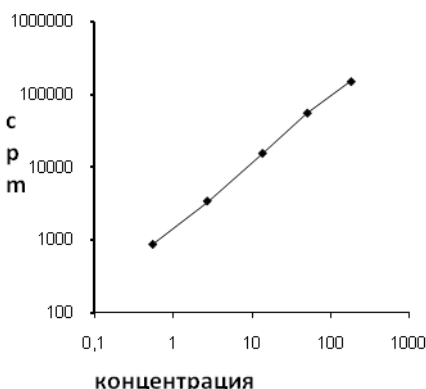
Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график В/Т (%) для каждого стандарта в соответствии с соответствующей концентрацией чФСГ.

Определите концентрацию чФСГ в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных прикладных программ автоматической обработки данных, в данном случае можно использовать логит-преобразование или аппроксимацию данных с помощью сплайн-функций.

**Таблица 2. Типичные данные количественного определения**

Пробирки	Среднее значение cpm	В/Т%
T	308164	-
S1	59	0.02
S2	364	0.12
S3	1810	0.59
S4	8414	2.73
S5	34174	11.1
S6	107452	34.9
C	7652	2.48



**Рисунок 1: Типичная стандартная кривая**  
(Не использовать для подсчета значений неизвестных образцов)

### Характеристика количественного определения

#### Типичные параметры количественного определения

NSB/T < 0,1 %

#### Чувствительность

При тестировании 20 копий нулевого стандарта было получено значение предела обнаружения, которое составило 0.08 мМЕд/мл. Чувствительность была определена как концентрация, соответствующая сумме среднего значения cpm и его двух стандартных отклонений.

#### Специфичность

При нормальных физиологических концентрациях не было выявлено перекрестной реактивности с чЛГ, чТСГ и чКГ.

#### Точность и воспроизводимость

С целью определения точности в ходе количественного определения были проанализированы 5 образцов сыворотки в 15 повторах. Для определения точности между количественными определениями, 5 образцов сыворотки измерялись дважды двумя операторами в ходе 15 независимых анализов. Полученные результаты приведены ниже в таблице.

В ходе количественного определения		Между количественными определениями	
Среднее значение (мМЕ/мл)	CV (%)	Среднее значение (мМЕ/мл)	CV (%)
0.24	6.1	0.26	7.6
1.61	2.6	1.68	3.7
6.5	2.5	6.7	2.7
26.0	0.7	26.2	1.3
84.6	3.0	84.0	1.9

### Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста насыщения образцов сыворотки известным количеством чФСГ. Средний процент восстановления для 6 образцов сыворотки с пиковыми значениями чФСГ на 3 уровнях был:  $97,3 \pm 3,5\%$ .

### Тест разведения (линейность)

Исследование 3 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Приведенная ниже формула, полученная для измеренной (Y) концентрации в сравнении с ожидаемой (X), указывает на хорошую линейность:

$$Y = 1,0222X + 0,04 \quad R = 0,9998 \quad n = 12$$

### Ожидаемые значения

мужчины: 1.0 - 10.5 мМЕ/мл

женщины:

овуляторный пик: 4.0 - 13.5 мМЕ/мл

пред- и постовуляторный период: 0.6 - 9.5 мМЕ/мл

постклимактерический период: 30 - 135 мМЕ/мл

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно устанавливала интервалы эталонных значений для своей группы больных.

### Ограничения

- Реактивы, предоставленные в данном наборе, оптимизированы для измерения уровня чФСГ в сыворотке крови.

- Следует избегать повторного замораживания и размораживания реактивов, а также образцов, предоставленных в данном наборе.

- Не следует использовать гемолизированные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.

- При концентрациях чФСГ до 100000 мМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствовал. Образцы сыворотки с концентрацией чФСГ выше, чем в самом концентрированном стандарте, следует развести S1 (0 мМЕ/мл) и провести анализ еще раз.

- Результаты исследования следует использовать совместно с другой релевантной клинической информацией

## Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Опытные реакционные пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы они не перемешивались с обычными опытными пробирками. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования, а после выполнения работы класть их обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется пометить маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

3) **Добавление промывочного буфера.** Для добавления промывочного буфера рекомендуется использование обычного лабораторного диспенсера со стеклянной емкостью объемом 1 л и гибкого выпускника для пробирки. При отсутствии данного оборудования может использоваться шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

## Дополнительная информация

Не следует смешивать между собой или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

## Меры предосторожности

### Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

### Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методик (ФИА, ферментативный иммуноферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1), поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg), антитрепонемных антител.

При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) или других инфекционных агентов.

Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

**Все продукты животного происхождения** и их производные были получены у здоровых животных. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

**Компоненты бычьего происхождения** были получены из стран, в которых не выявлялись случаи бычьей спонгиозной энцефалопатии. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

## Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 68 мг.

	Использовать до		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	См. руководство по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики in vitro		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал
	Номер по каталогу		
			

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)

Коммерческий e-mail: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

**IZOTOP**

INSTITUTE OF ISOTOPES LTD.

1535 Budapest Pf.: 851.

Тел.: (36-1)392-2577,

Факс: (36-1)395-9247

Обновлено: 02.01.2016