



НАБОР ИФА для определения лютеинизирующего гормона (ЛГ)

Кат. № : EIA-1289
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 12-2008
Версия 6.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

Данный набор является иммуноферментным анализом для количественного измерения в диагностике *in vitro* лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке.

1.2 Краткое описание и объяснение

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) продуцируется у мужчин и женщин передней долей гипофиза в ответ на действие ЛГ-рилизинг гормона, который вырабатывается в гипоталамусе. ЛГ также вырабатывается интерстициальным стимулирующим клетки гормоном (ICSH) в мужчин - гликопротеин, молекулярным весом приблизительно 30 000 Д. Он состоит из двух нековалентно связанных ассоциированных различных аминокислотных цепей, альфа и бета. Альфа-цепь похожа с такой у тиреотропного гормона (ТТГ), фолликулостимулирующего (ФСГ) и человеческого хорионического гонадотропина (ЧХГ). Вся разница между ними состоит из различных комбинаций аминокислот бета-цепи, которая и отвечает за иммунологическую дифференциацию.

Базальная секреция ЛГ у человека эпизодична и первичная его функция состоит в стимулировании интерстициальных клеток (клеток Лейдига), вырабатывающих тестостерон. Различие концентраций ЛГ в сыворотке связано у здоровых женщин с нормальным менструальными циклом и зависит от взаимодействий системы гонады-гипофиз-гипоталамус. Уменьшение прогестерона и эстрадиола после овуляции запускает менструальный цикл. При их уменьшении гипоталамус увеличивает продукцию гонадотропного рилизинг-факторов (ГРФ), которые в свою очередь стимулируют гипофиз с увеличением продукции и секреции ФСГ. Увеличение ФСГ активирует несколько фолликулов в течение фолликулярной фазы, один из них станет зрелой яйцеклеткой. Когда фолликул развивается начинает секретироваться эстрадиол, вначале медленно, потом, к 12 или 13 дню нормального цикла, - все более увеличиваясь. ЛГ освобождается в связи с этой быстрой секрецией эстрадиола, который прямо стимулирует гипофиз с увеличением уровней ГРФ и ФСГ. Эти изменения лежат в основе преовуляторной фазы.

В промежутке 12-18 часов после достижения ЛГ наивысшего уровня происходит овуляция. После освобождения яйцеклетки, образуется желтое тело, которое секретирует прогестерон и эстроген - два гормона, взаимодействующие с ЛГ по механизму обратной связи.

После овуляции наступает сразу постовуляторная фаза с высокими уровнями прогестерона, вторым пиком эстрадиола и низкими уровнями ЛГ и ФСГ. Низкий уровень ЛГ и ФСГ объясняется влияниями по механизму обратной связи на систему гипоталамус-гипофиз эстрадиола и прогестерона.

После оплодотворения растущий плод вырабатывает ЧХГ, который продолжает активировать желтое тело для выработки прогестерона и эстрадиола. Если беременность не наступила, желтое тело регрессирует и наблюдается соответствующее уменьшение уровней прогестерона и эстрадиола, что проявляется менструацией. Из-за низкого их уровня гипоталаму вновь инициирует менструальный цикл.

У пациентов с гипогонадизмом наблюдается увеличенная концентрация ЛГ. Уменьшение продукции стероидных гормонов у женщин связан с незрелостью яичников, первичной их недостаточностью, поликистозом яичников или менопаузой; в этих случаях уровень ЛГ не регулируется. Похожее расстройство регуляции встречается у мужчин при недоразвитии или отсутствии яичек. Высокие концентрации ЛГ также встречаются при первичной недостаточности яичек и синдроме Кляйнфельтера, хотя при сохранении выработки андрогенов уровень ЛГ не обязательно увеличивается. Увеличение ЛГ также сопутствует почечной недостаточности, циррозу, гипертиреозидизму и истощению.

При диагностике гипоталамической, гипофизарной или гонадальной дисфункции должно проводиться определение ЛГ вместе с ФСГ.

Уровни гормонов используются для определения менопаузы, овуляции и мониторинга эндокринной терапии.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

DRG LH EIA есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммуносорбентный набор (ELISA), основанный на принципе «сендвича». Микротитрационные лунки, покрыты моноклональными антителами к единственному в своем роде антигену на β -ЛГ молекулах. Сыворотка пациента, которая содержит эндогенный ЛГ инкубируется в лунках, покрытых ферментным конъюгатом, (анти-ЛГ-сыворотка, конъюгирована с пероксидазой). После инкубации несвязанный конъюгат вымывается водой. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации ЛГ в образцах. После добавления раствора субстрата, насыщенность цвета пропорциональна концентрации ЛГ в образце.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Для диагностики *in vitro*.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Лист данных безопасности доступен по требованию.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. Микротитровальные лунки, 12x8 (делимых) полосок, 96 лунок, покрытых анти-LH моноклональным антителом.

2. Стандарт (0-5), 6 флаконов (лиофилизированных) 1 мл. Концентрация: 0, 10, 20, 40, 100, 200 мМЕ/мл.

Стандарты откалиброваны согласно 2-го Международного стандарта ВОЗ LH IRP (80/552). См. «Приготовление реагентов».

*содержат 0,03% Проклин 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консерванта.

3. Ферментный конъюгат, 1 флакон, 11 мл, готовое к использованию анти-LH антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена.

*содержит 0,03% Проклин 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консерванта.

4. Раствор субстрата, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию тетраметилбензидин (ТМБ).

5. Стоп раствор, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию. Содержит 0,5 М H₂SO₄, 6 мл.

Избегайте контакта со стоп раствором. От может вызвать раздражения кожи и ожоги.

* BND = 5-бromo-5-нитро-1.3-диоксан

MIT = 2-метил-2Н-изотиазол-3-дин

Примечание: Дополнительные 0 стандарт для разбавления образца предоставляется по запросу.

4.2 Требуемое, но не поставляемое оборудование и материалы

- Микротитровальный планшеточный откалиброванный считыватель (450 +/- 10 нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.

- Таймер.
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки данных.

4.3 Условия хранения

При хранении при 2-8⁰С неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности. Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8⁰С. Микропланшет необходимо хранить при 2-8⁰С. Иммунореактивность поверхности лунок на планшете стабильна в плотно упакованном виде с осушителем после открытия приблизительно 6 недель.

4.4 Приготовление реагентов

Приведите все реагенты и необходимое количество полоски, что будут использоваться к комнатной температуре.

Стандарты

Разбавьте лиофилизированное содержимое флакона стандарта с 1 мл дистиллированной воды.

Примечание: Разбавленные стандарты стабильны 2 месяца при 2-8⁰С. Для более длительного хранения – заморозьте до -20⁰С.

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности.

4.6 Поврежденные наборы

При повреждении набора или компонентов, необходимо уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться только сыворотка.

Не используйте для анализа гемолизированные, желтушные и липемические пробы.

Помните: в анализе не должны использоваться образцы, что содержат азид натрия.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного осада. Для пациентов, что получили антикоагулянтную терапию, может быть необходимо большее время для осада.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 48 часов при 2-8⁰С.

Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20⁰С и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить 0 стандартом и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

Например:

- Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);
- Разбавление 1:100: 10 мкл от разбавления 1:10 + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Основные замечания

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.

- В основном энзимная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.
- Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей необходимо закончить в течении 6 минут (помните это при ручном пипетировании).

6.2 Процедура анализа

Каждая процедура должна включать калибровочную кривую.

1. Установите в рамке желаемое количество микротитровальный лунок.
2. Пипеткой внесите **25 мкл** каждого стандарта, контролей и образцов, используя новые наконечники, в соответствующие лунки.
3. Добавьте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку. Тщательно перемешивайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **30 минут** при комнатной температуре.
5. Резко встряхните содержимое лунок.
Промойте лунки **5 раз** дистиллированной водой (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшетку на абсорбирующей бумаге, чтобы удалить остатки влаги.
Важное замечание:
Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Добавьте **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубируйте **10 минут** при комнатной температуре.
8. Остановите ферментную реакцию, добавив **50 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки с помощью микротитровального планшетного считывателя при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси У и концентрации на оси Х.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить или принимать как > 200 мМЕ/мл. При вычислении концентрации необходимо учитывать этот коэффициент разбавления.

6.3.1 Пример типичной калибровочной кривой

Стандарт	мМЕ/мл	Опт. единицы (450 нм)
Стандарт 0	0	0,04
Стандарт 1	10	0,12
Стандарт 2	20	0,26
Стандарт 3	40	0,49
Стандарт 4	100	1,22
Стандарт 5	200	1,82

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, что б каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

При изучении очевидно здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие данные:

Население	ЛГ (мМЕ/мл)
Взрослые женщины:	
Фолликулярная и лютеальная фаза	≤20
Скачек ЛГ	20-200
Женщины, пост-менопауза	20-100
Мужчины	3-12

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 1,27-200 мМЕ/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность.

Протестированные гормоны	Концентрация	Интенсивность цвета, эквивалентная ЛГ в сыворотке (мМЕ/мл)
HGG (WHO 1 st IRP75/5370)	200 мМЕ/мл	5,2
TSH (WHO 2 nd IRP 80/558)	62 мкМЕ/мл	3,0
FSH (WHO 1 st IRP 68/40)	200 мМЕ/мл	2,5

Примечание:

Беременность ведет к повышенному уровню ХГЧ, поэтому использование ИФА ЛГ не рекомендуется во время беременности или сразу после родов.

9.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена из среднего значения плюс двух стандартных отклонений 20 репликатов анализа 0 стандарта и составила 1,27 мМЕ/мл.

9.4 Точность

9.4.1 Точность внутри анализа

Образец	1	2	3
Среднее (мМЕ/мл)	2,71	15,72	28,33
Стандартное отклонение (мМЕ/мл)	0,21	0,71	1,29
КВ (%)	7,62	4,54	4,57
Кол-во	10	10	10

9.4.2 Точность между анализами

Образец	1	2	3
Среднее (мМЕ/мл)	2,33	15,36	28,96
Стандартное отклонение (мМЕ/мл)	0,26	0,50	1,29
КВ (%)	11,02	3,22	4,45
Кол-во	10	10	10

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением ЛГ растворов при известной концентрации 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Сы-во-рот-ка	Эндогенный ЛГ (мМЕ/мл)	Добавл. ЛГ (мМЕ/мл)	Измер. конц. ЛГ (мМЕ/мл)	Ожидаемый* ЛГ (мМЕ/мл)	Восстановление (%)
1	7,7	0	7,7		
		100	98,2	103,9	94,5
		50	55,9	53,9	103,8
		20	25,6	23,9	107,4
		10	12,9	13,9	93,0
2	23,6	0	23,6		
		100	101,7	111,8	90,9
		50	59,9	61,8	96,9
		20	31,0	31,8	97,5
		10	19,8	21,8	90,7
3	52,7	0	52,7		
		100	114,2	126,3	90,4
		50	70,9	76,3	92,8
		20	42,8	46,3	92,2
		10	32,6	36,3	89,7

(*Эндогенный ЛГ/2 + добавленный ЛГ через 1:1 разбавление сыворотки обогащающим материалом.)

9.6 Линейность

(См. таблицу в оригинале инструкции на стр. 8).

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на измерение ЛГ в образце.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

Не наблюдалось эффекта до 10 000 мМЕ/мл ЛГ.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные, только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

11.3 Надежность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не являются под ответственностью производителя.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua

