

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА (ЛГ)

4225-16, Luteinizing Hormone (LH)

Каталог. № : 4225-16
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 01-09-2015



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	LH ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой сэндвич-ИФА
Диапазон обнаружения	0-200 мМЕд/мл
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	96 %
Чувствительность	2.0 мМЕд/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения Лютеинизирующего Гормона (ЛГ) в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

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 взаимодействия 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 уровня 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, гипертиреозу и истощению.

Недостаточная секреция передней доли гипофиза может вызывать низкие уровни ЛГ. Низкие уровни могут стать причиной бесплодия у мужчин и женщин. Низкие уровни ЛГ могут быть также связаны с уменьшением секреции ГРФ гипоталамусом, хотя этот же эффект может наблюдаться при недостаточном ответе передней доли гипофиза на стимуляцию ГРФ. Низкие уровни ЛГ могут также указывать на некоторые дисфункции гипофиза или гипоталамуса, но действительная причина должна быть подтверждена другими тестами.

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.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DAI LH EIA является твердофазным энзимно-связывающим иммуносорбентным анализом (ELISA). В анализе используется анти-ЛН антитело для иммобилизации твердой фазы (микротитрационные ячейки) и мышиное моноклональное анти-ЛН антитело в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгата. Тестовый образец одновременно реагирует с антителами, в результате молекулы ЛН будут в «сэндвиче» между твердой фазой и энзимно-связанными антителами. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются водой для удаления несвязанных маркированных антител. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется на 20 минут, в результате происходит развитие голубого окраса. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация ЛН прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Набор предназначен для работы с образцами сыворотки без добавок.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы, входящие в состав набора:

- Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
- Набор стандартов, содержащих 0, 5, 20, 50, 100 и 200 мМЕд/мл (ВОЗ, 1-й ИРР, 68/40), лиофилизированные.
- Ферментный конъюгат, 12 мл.
- ТМВ субстрат, 12 мл.
- Стоп-раствор, 12 мл.
- Промывочный буфер (50X), 15 мл.

Материалы, не входящие в состав поставки:

- Точные пипетки: 40 мкл - 200 мкл и 1.0 мл.
- Наконечники для пипеток.
- Дистиллированная вода.
- Вихревой смеситель или аналог.
- Промокательная бумага или бумажное полотенце.
- Бумага для построения графиков.
- Микротитровальный планшетный ридер.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием доведите реагенты до комнатной температуры (18-22 °C).
2. Разведите каждый лиофилизированный стандарт 0.5 мл дистиллированной воды и оставьте перерастворенный материал, по крайней мере, на 20 минут. Перерастворенные стандарты должны храниться в закрытых флаконах при 2-8 °C.
3. Разведите 1 часть Промывочного Буфера (50x) с 49 частями дистиллированной воды, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите нужное количество лунок с антителами в рамку для стрипов. Создайте лист данных с идентификацией образца.
2. Внесите 50 мкл стандарта, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.

- Тщательно перемешивайте содержимое лунок в течении 30 секунд. Важно на этом этапе добиться полного перемешивания.
- Инкубируйте пробы при комнатной температуре (18-22 °C) в течении 60 мин.
- Удалите инкубационную смесь, перевернув содержимое планшета над раковиной.
- Промыть лунки промывочным буфером (1x) 5 раз.
- Резко стукнуть лунками о промокательную бумагу или бумажные полотенца для удаления всех остатков жидкости.
- Внесите 100 мкл раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
- Инкубируйте при комнатной температуре в течении 20 мин.
- Остановите реакцию внесением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
- Аккуратно перемешивайте на протяжении 30 сек. до смены окраски раствора на желтую.
- Используя ридер для планшетов, измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм на протяжении 15 мин.

Внимание:

Процедура промывки имеет большое значение. При недостаточно тщательном промывании результаты будут неточными, и уровень поглощения будет завышен.

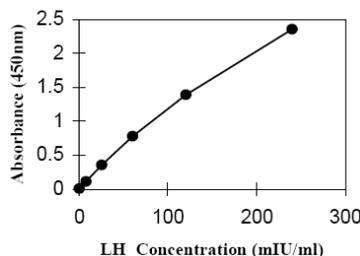
РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитать средние значения поглощения (A_{450}) для каждого стандарта, контрольных сывороток и образцов. На бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в мМЕд/мл на горизонтальной оси (X). С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию ЛГ в мМЕд/мл.

Пример калибровочной кривой

Результаты типичного использования стандартов со считыванием ОП при 450 нм указаны на оси Y против концентраций ЛГ на оси X. Настоящая калибровочная кривая приведена в качестве иллюстрации и не должна использоваться для расчета неизвестных значений. Каждый пользователь должен получить свои собственные данные и калибровочную кривую.

ЛГ (мМЕд/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0.000
5	0.169
20	0.552
50	1.150
100	2.079
200	3.027



Ожидаемые значения и чувствительность

Для каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные значения уровней ЛГ, соответствующие нормальным, на основании результатов анализа статистически достоверного количества клинически охарактеризованных образцов крови. Приведенные ниже значения уровней ЛГ считать приблизительными:

Взрослый мужчина	0-25 мМЕд/мл
Женщина фолликулярная фаза	0-40 мМЕд/мл
Середина цикла	40-150 мМЕд/мл
Лютеальная фаза	0-30 мМЕд/мл
Пост менопауза	20-200 мМЕд/мл
Перед половой зрелостью, женщина	0-9 мМЕд/мл
Перед половой зрелостью, мужчина	0-17 мМЕд/мл

Минимальная концентрация ЛГ, определяемая с помощью этого набора, составляет 2 мМЕд/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Достоверность: сравнение между нашим тестом и коммерчески доступным тестом предоставило следующие данные:

N = 113
 Коэффициент корреляции = 0.912
 Наклон = 0.894
 Пересечение = 3.96
 Среднее (наши наборы) = 10.1
 Среднее (DPC) = 7.3

II. Точность:

1) Внутрисерийная:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	4.90	0.32	6.47
Уровень 2	20	23.59	1.37	5.80
Уровень 3	20	57.86	3.97	6.87

2) Между сериями:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	5.11	0.48	9.45
Уровень 2	20	23.88	1.71	7.15
Уровень 3	20	57.70	3.30	5.71

III. Линейность:

Две сыворотки пациента серийно разводили со Стандартом 0 нг/мл в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 102.1 %.

Образец А			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	105.47	105.47	
2X	52.74	54.72	103.8
4X	26.37	28.59	108.4
8X	13.19	13.88	105.3
16X	6.60	6.98	105.8
Среднее восстановление: 105.8 %			

Образец В			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	78.08	78.08	
2X	39.04	39.17	100.3
4X	19.52	18.70	95.8
8X	9.76	9.34	95.7
16X	4.88	4.97	101.8
Среднее восстановление: 98.4 %			

IV. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известным уровнем ЛН смешивались и анализировались в дубликатах. Среднее восстановление составило 99.0 %.

Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
5.98	6.48	108.4
23.65	25.31	107.1
35.64	36.43	102.2
46.95	51.10	108.8
72.32	69.37	95.9
91.78	86.61	94.4
Среднее восстановление: 102.8 %		

V. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 2.0 мМЕд/мл.

VI. Перекрестная реактивность

Следующие материалы человеческого происхождения были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Concentration	Equivalent LH	% Cross-Reactivity
hCG	400,000 mIU/ml	58.5 mIU/ml	0.015
TSH	500 µIU/ml	0.00 mIU/ml	0.000
FSH	500 mIU/ml	0.00 mIU/ml	0.000

VII. Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался при концентрациях до 4.000 мМЕд/мл ЛН.

ХРАНЕНИЕ

Как невскрытый, так и вскрытый набор следует хранить при 2-8 °С, а планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Для измерения абсорбции используется микропланшетный ридер при ширине полосы 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com