



## LH (Urine) ELISA

**Иммуноферментный набор для количественного определения лютеинизирующего гормона (ЛГ) в моче.**

Кат. №. RE52111

Версия 1 / 1999-02

Количество образцов 96 (со съёмными полосками)

Хранение при 2-8°C

Только для диагностики *in vitro*

### Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

### 1. Назначение

Данный набор предназначен для количественного определения лютеинизирующего гормона (ЛГ) середины цикла в моче, с целью прогноза времени овуляции.

#### 1.1 Клиническая значимость

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) продуцируется у мужчин и женщин передней долей гипофиза под действием рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH или Gn-RH), который высвобождается из гипоталамуса (1-3).

ЛГ, также известный как гормон, стимулирующий интерстициальные клетки, (ICSH, ГСИК) у мужчин, это гликопротеин с молекулярной массой приблизительно 30.000 дальтон (4). Он состоит из двух нековалентно связанных различных аминокислотных цепей, альфа и бета (5). Альфа-цепь аналогична альфа-цепи человеческого тиреотропного гормона (TSH, ТТГ), фолликулостимулирующего гормона (FSH, ФСГ), и человеческого хорионического гонадотропина (hCG, ХГЧ). Различие между этими гормонами состоит в аминокислотном составе их бета-субъединиц, что позволяет выполнять их иммунологическую дифференциацию (6-8).

Базовая секреция ЛГ у мужчин носит эпизодический характер и основной функцией является стимуляция интерстициальных клеток (клеток Лейдига) для продукции тестостерона. Вариации уровня ЛГ у здоровой менструирующей женщин связаны с циклом овуляции, и зависят от последовательности гормональных событий гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Снижение уровней прогестерона и эстрадиола предшествующие овуляции инициируют каждый менструальный цикл (9,10). В результате снижения уровня гормонов, усиливается секреция гипоталамусом гонадотропин-релизинг факторов (GnRF), которые, в свою очередь, продукцию и

секрецию ФСГ стимулируют гипофизом (4). Повышение уровня ФСГ стимулирует несколько фолликул в фолликулярной фазе, одна из которых созревает, до выхода яйцеклетки. На протяжении развития фолликулы секретруется эстрадиол, в начальный период медленно, а затем, к 12 или 13 дню нормального цикла быстро повышается. В результате этого быстрого повышения эстрадиола происходит выброс ЛГ, из-за прямой стимуляции гипофиза и повышения уровней GnRF и FSH. Эти события составляют пре-овуляторную фазу. (11).

Овуляция наступает приблизительно через 12 - 18 часов после достижения максимального уровня ЛГ. После выхода яйцеклетки формируется *corpus luteum* (желтое тело), секретирующее прогестерон и эстроген два регулятора ЛГ (3,10).

Лютеиновая фаза быстро сменяется фазой овуляции, для которой характерны высокий уровень прогестерона, вторым подъемом эстрадиола и низкими уровнями ЛГ и ФСГ (12). Низкие уровни ЛГ и ФСГ являются результатом эффекта отрицательной обратной связи эстрадиола и прогестерона на гипоталамно-гипофизарную ось.

После оплодотворения развивающийся эмбрион продуцирует ХГЧ, поддерживающий продукцию прогестерона и эстрадиола желтым телом. Если беременность не наступает, желтое тело регрессирует, и соответствующим образом происходит падение уровней прогестерона и эстрадиола, приводящее к наступлению менструации. Гипоталамус вновь инициирует менструальный цикл, из-за этого низкого уровня гормонов. (12).

У больных, страдающих гипогонадизмом, показаны повышенные концентрации ЛГ в сыворотке. Снижение продукции стероидных гормонов у женщин является результатом неразвитых яичников, первичной недостаточности яичников, синдрома поликистозных яичников, или менопаузы; в этих случаях секреция ЛГ не регулируется (10,13). Аналогичная потеря регуляторных гормонов встречается у мужчин при аномалиях развития яичек, или анорхизме. Высокая концентрация ЛГ может выявляться при первичном гипогонадизме, синдроме Клайнфельтера, хотя уровень ЛГ не обязательно будет повышен, если секреция андрогенов продолжается. Повышенная концентрация ЛГ наблюдается при почечной недостаточности, циррозе, гипертиреозе, тяжелом истощении (10,14).

Недостаток секреции передней долей гипофиза может быть причиной низкого уровня ЛГ. Как и можно ожидать, низкий уровень может приводить к бесплодию и у мужчин, и у женщин. Низкий уровень ЛГ может быть также вызван сниженной секрецией GnRH гипоталамусом, хотя тот же эффект может наблюдаться и при недостаточном ответе передней доли гипофиза на стимуляцию GnRH. Низкие значения ЛГ могут, следовательно, указывать на дисфункцию гипофиза или гипоталамуса, но реальная причина должна быть установлена другими методами (10).

IBL, RE53031 Proinsulin ELISA

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва,

e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

Версия: 2 / 2003-12-18

Ленинские горы, тел. (495) 647-2740

(многоканальный),

9392421, 9395808, факс (495) 939-09-97.

[www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)

В дифференциальной диагностике дисфункции гипоталамуса, гипофиза или гонад обычно определение концентрации ЛГ выполняется в сочетании с определением уровня ФСГ, так как их функции тесно взаимосвязаны.

Кроме того, измерение уровня гормонов может быть использовано для определения менопаузы, точного определения овуляции и мониторинга эндокринной терапии.

## 2. Принцип метода

Метод **ЛН ЕІА** основан на «сэндвич» методе ИФА (ELISA). Моноклональные антитела к уникальной антигенной детерминанте β-цепи молекулы ЛГ сорбированы в лунках микропланшета. Образцы мочи, содержащие эндогенный ЛГ, инкубируют в покрытых лунках, в присутствии ферментного конъюгата, который представляет собой антитела к ЛГ, конъюгированные с пероксидазой хрена. Вслед за инкубацией промывкой удаляют несвязавшийся конъюгат. Количество связавшегося конъюгата пропорционально концентрации ЛГ в образце. Затем в лунки вносят ферментный субстрат (ТМВ) и развившееся окрашивание оценивают с помощью микропланшетного спектрофотометра (ридера). Интенсивность окрашивания в лунках пропорциональна количеству ЛГ в образце.

### 3.1 Поставляемые реагенты:

Количество	Компонент
1 x 12x8	<b>Микропланшет.</b> 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипов (96 лунок), покрытых моноклональными антителами к ЛГ, в вакуумной упаковке с осушителем. Готовы к использованию!
11 мл	Ферментный конъюгат, содержит анти-ЛГ антисыворотку, конъюгированную с пероксидазой.
11 мл	<b>Субстратный раствор ТМВ</b> Готов к использованию. Содержит раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ).
6 x 0.5 мл	<b>Стандарты,</b> моча, по 0.5 мл каждого, с концентрациями 0, 10; 20; 40; 100; 200 мМЕд/мл (калибровка: WHO 80/552).
6 мл	<b>Стоп-раствор.</b> Содержит 0.5 М H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Готов к использованию.

### 3.2 МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

1. Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 450 ±10 нм
2. Микропипетки для внесения объемов 25, 50 и 100 мкл
3. Стандартный холодильник
4. Фильтровальная бумага

### 3.3 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Невскрытый набор хранится при температуре 2-8°C до истечения срока годности. Не используйте реагенты после истечения срока годности.

Ферментный конъюгат, раствор субстрата, стандарты и нулевой стандарт должны храниться при 2° - 8°C.

Микропланшет должен храниться при 2° - 8°C. Иммунореактивность покрытых лунок стабильна в

течение 6 недель, если вскрытый микропланшет храниться в плотно закрытом пакете с осушителем.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. При тестировании всех реагентов данного набора, содержащих человеческую сыворотку или плазму, на присутствие HIV I/II, HBsAg и HCV были получены отрицательные результаты. Однако нельзя абсолютно исключать присутствия этих или каких-либо других инфекций, следовательно при использовании и утилизации с реагентами необходимо обращаться как с потенциально биологически опасными материалами.
2. Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.
3. Закрывайте крышки реагентов сразу после использования реагента. Не меняйте крышки местами.
4. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид натрия, не могут быть использованы в энзиматической реакции.
5. Не пипетируйте ртом
6. Набор – только для диагностики in vitro.
7. Не смешивайте или не используйте реагенты из разных лотов.

## 5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Рекомендуется собрать первую утреннюю мочу (натощак). Образцы мочи можно собирать в пластиковые или стеклянные пробирки. Перед тестированием центрифугирование не требуется. Мутные образцы могут быть протестированы без специальной обработки.

2. Образцы необходимо тщательно закрыть. Образцы могут храниться до 48 часов при 2-8°C перед тестированием. Для более длительного хранения образцы должны быть заморожены, только один раз, при -20°C. Оттаявшие образцы необходимо тщательно перемешать переворачиванием перед тестированием.

**ВНИМАНИЕ!** Данный метод предназначен только для тестирования образцов, не содержащих каких-либо добавок.

## 6. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

### 6.1 Общие замечания

1. Все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-25 °C) перед тестированием. Перемешивайте реагенты, избегая образования пены.
2. Все стадии анализа должны проводиться без остановок.
3. Избегайте контаминации реагентов, микропипеток и пробирок. Используйте только новые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта или образца.
4. В общем случае ферментативная реакция прямо пропорциональна времени и температуре. Перед началом тестирования рекомендуется подготовить все реагенты, открыть крышки, установить необходимое количество лунок в рамку-держатель и т.д. Это гарантирует одинаковое время на каждом шаге пипетирования, без прерываний.
5. Данный набор для определения ЛГ разработан так, чтобы получать максимум абсорбции в диапазоне 1.0 - 2.0 в течение 10 минут при комнатной температуре (22°C). Если значение максимальной абсорбции находится выше верхнего предела определений используемого ридера, или ниже 1.0, необходимо

IBL, RE53031 Proinsulin ELISA

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва,

e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

Версия: 2 / 2003-12-18

Ленинские горы, тел. (495) 647-2740

(многоканальный),

9392421, 9395808, факс (495) 939-09-97.

[www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)

увеличить или сократить (соответственно) время инкубации последней энзиматической реакции образования окрашивания. В общем случае Энзиматическая реакция прямо пропорциональна времени и температуре. Это делает возможной интерполяцию при фиксированных физикохимических условиях.

### 6.2 Замечания по процедуре:

1. Ручное пипетирование: Рекомендуется не использовать более 32 лунок для одной постановки. Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно быть завершено в течение 3х минут.
2. Автоматическое пипетирование: в одной постановке может быть использован весь микропланшет, 96 лунок. Однако рекомендуется завершить пипетирование всех стандартов, контролей и образцов в течение 3 минут.
3. Все стандарты, контроли и образцы должны анализироваться в дублях, при этом все условия тестирования должны быть одинаковые.

### 6.3. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА (КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ)

1	Установите необходимое количество стрипов в держатель.
2	Внесите по 25 мкл каждого стандарта (0; 10; 20; 50; 100; 200 мМЕд/мл), контроля и образца в соответствующие лунки микропланшета. Используйте новые одноразовые наконечники.
3	Добавьте в каждую лунку по <b>100 мкл ферментного конъюгата</b> .
4	Тщательно перемешайте в течение 10 секунд. Важно достичь полного перемешивания реагентов на данном этапе.
5	Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
6	Удалите инкубационный раствор из лунок.
7	Промойте каждую лунку 5 раз проточной водой.
8	После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Внесите в каждую лунку по <b>100 мкл раствора субстрата ТМВ</b> , с одинаковой скоростью.
10	Инкубируйте в течение <b>10 минут при комнатной температуре</b> .
11	Остановите реакцию добавлением во все лунки по <b>50 мкл стоп-раствора</b> . Внесение раствора должно выполняться в том же порядке и с той же скоростью, что и в п. 9.
12	<b>Измерьте</b> оптическую плотность с помощью спектрофотометра при длине волны <b>450±10 нм</b>

#### Стабильность конечной реакции

Считывание ОП рекомендуется выполнить в течение 10 минут после остановки реакции (шаг 11).

### 6.4. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА (КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ)

Данная Процедура подходит для определения ЛГ середины цикла в образцах мочи. Образцы тестируют совместно со стандартами 20 и 40 мМЕд/мл. Процедура анализа точно такая же, как и для количественного определения, но шаги 11 и 12 пропускаются.

### 7. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

IBL, RE53031 Proinsulin ELISA

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва,

e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

1. Рассчитайте средние значения дублей для каждого стандарта, контроля и образца.

2. 1. Постройте калибровочную кривую. Полученные значения ОП стандартов откладывают по оси Y, а соответствующие концентрации стандартов, в мМЕд/мл, по оси X.

3. Используя среднее значение абсорбции каждого образца, определите соответствующую концентрацию ЛГ, в мМЕд/мл, из калибровочной кривой. В зависимости от опыта и/или доступности программного обеспечения могут быть использованы другие методы оценки результатов.

4. Если образцы были разведены, при расчете значения, полученные из калибровочной кривой, необходимо умножить на коэффициент разведения.

### 7.1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Для качественного определения уровня ЛН окрашивание в лунках с образцами сравнивают с окрашиванием в лунках со стандартами 20 и 40 мМЕд/мл.

Референсные стандарты.

\*< 20 мМЕд/мл ЛГ: если голубое окрашивание менее интенсивно, или эквивалентно окрашиванию в лунке с стандартом 20 мМЕд/мл

\*>20 и <40 мМЕд/мл ЛГ: если голубое окрашивание более интенсивно, чем в лунке с стандартом 20 мМЕд/мл, но менее интенсивно по сравнению с окрашиванием в лунке с стандартом 40 мМЕд/мл

\*>40 мМЕд/мл ЛГ: если голубое окрашивание более интенсивно, или эквивалентно окрашиванию в лунке с стандартом 40 мМЕд/мл

### 7.2 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить диапазон нормальных значений проинсулина.

Представленные ниже данные получены данным методом при тестировании случайно выбранных образцов:

	ЛГ, мМЕд/мл			
	возраст	Кол-во	среднее	диапазон
Мужчины (не достигшие половой зрелости)	<10	10	1.1	0 to 2.9
Мужчины (нормальные взрослые)	18-65	30	4.6	1.0 - 13.8
Женщины (не достигшие половой зрелости)	<10	8	0.8	0 - 1.5
Женщины (нормальные взрослые)	20-36	47	14.8	0.6 - 96.2
-фолликулярная и лютеиновая фазы				<20
-ЛГ середины цикла				40 - 200
Женщины (постменопауза)	46-60	23	36.3	8.4 - 102.0

### 8. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

#### Чувствительность

Версия: 2 / 2003-12-18

Ленинские горы, тел. (495) 647-2740

(многоканальный),

9392421, 9395808, факс (495) 939-09-97.

[www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)

Минимальная определяемая концентрация ЛГ данным методом составила 2 мМЕд/мл.

#### Воспроизводимость

##### а. Внутри серии:

Воспроизводимость внутри серии определяли из многократных определений трех различных контрольных образцов в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии приведена в таблице ниже:

Образец	1	2	3
Количество повторов	18	18	18
Средняя концентрация ЛГ (мМЕд/мл)	4.88	23.59	57.86
Стандартное отклонение (SD)	0.32	1.37	3.97
Коэффициент вариации (CV, %)	0.66	5.80	6.87

##### б. Между сериями:

Воспроизводимость между сериями определяли из многократных определений трех различных контрольных образцов в различных постановках. Воспроизводимость между сериями приведена в таблице ниже:

Образец	1	2	3
Количество повторов	39	24	24
Средняя концентрация ЛГ (мМЕд/мл)	5.11	23.88	57.70
Стандартное отклонение (SD)	0.48	1.71	3.30
Коэффициент вариации (CV, %)	9.39	7.16	5.71

#### Извлечение и линейность

##### а. Извлечение

Различные образцы сывороток с известным содержанием ЛГ были смешаны и протестированы, в дублях. В среднем извлечение составило 102.8%.

Ожидаемая концентрация, мМЕд/мл	Измеренная концентрация, мМЕд/мл	Извлечение, %
5.98	5.09	101.2
23.65	25.31	107.0
35.64	36.43	102.2
46.95	51.10	108.8
72.32	69.37	95.9
91.78	86.61	94.4

##### б. линейность

Для анализа линейности два образца были серийно разведены нулевым стандартом и протестированы. В среднем извлечение составило 101.6%.

№ образца	разведение	Ожидаемая концентрация, мМЕд/мл	Измеренная концентрация, мМЕд/мл	Извлечение, %
1	Без разведения	105.47	105.47	100.0
	1:2	52.74	54.72	103.8
	1:4	26.37	28.95	109.7
	1:8	3.19	13.88	105.2
	1:16	6.60	6.98	105.8
2	Без разведения	78.08	78.08	100.0
	1:2	39.04	39.17	100.3
	1:4	19.52	18.70	95.8
	1:8	9.76	9.34	95.7
	1:16	4.88	4.97	101.8
	1:32	2.44	2.34	95.9

#### 8.4 Специфичность

Следующие гормоны были протестированы на перекрестную реактивность данным методом:

гормон	концентрация	При тестировании интенсивность окрашивания эквивалентна ЛГ в моче (мМЕд/мл)
ХГЧ (WHO 1st IRP75/537)	200 мМЕд/мл	5.2
ТТГ (WHO 2nd IRP 80/558)	62 мМЕд/мл	3.0
ФСГ (WHO 1st IRP 68/40)	200 мМЕд/мл	2.5

ЗАМЕЧАНИЕ: Уровень ХГЧ во время беременности повышается, не рекомендуется использовать иммуоферментный метод определения ЛГ для тестирования образцов, взятых во время беременности или сразу после родов.

#### 8.5 Хук-эффект

Хук-эффект при тестировании данным методом не обнаружен до концентрации ЛГ 4000 мМЕд/мл.

#### 9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Правила GLP (Good Laboratory Practice, хорошей лабораторной практики) требуют, чтобы контроли были включены в каждую постановку. Должно быть протестировано статистически значимое количество контролей, для определения средних значений и допустимых диапазонов для гарантии соответствующего качества исследований. Контрольные образцы не должны содержать азид натрия.

#### 10. Ограничения метода

1. Точные и достоверные результаты могут быть получены только в случае полного понимания и точного исполнения инструкции, поставляемой в наборе, и соблюдения правил хорошей лабораторной практики.
2. Процедура промывки очень важна. Неполная или неправильная промывка приводит к низкой точности и воспроизводимости, и ложно высоким значениям абсорбции.

#### СХЕМА МЕТОДА IBL LH URINE ELISA KIT

Описание	Стандарт, образец, мкл	Ферментный конъюгат, мкл		Раствор субстрата, мкл		Стоп-раствор, мкл		Результат, мМЕд/мл
Стандарт 0	25	100	Перемешать 10 секунд. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре. Промойте лунки 5 раз водой	100	Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.	50	Считать ОП при 450 нм с помощью ридера	0
Стандарт 1	25	100		100		50		10
Стандарт 2	25	100		100		50		20
Стандарт 3	25	100		100		50		40
Стандарт 4	25	100		100		50		100
Стандарт 5	25	100		100		50		200
Образец 1	25	100		100		50		
Образец 2	25	100		100		50		
Образец 3	25	100		100		50		

IBL, RE53031 Proinsulin ELISA

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва,

e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

Версия: 2 / 2003-12-18

Ленинские горы, тел. (495) 647-2740

(многоканальный),

9392421, 9395808, факс (495) 939-09-97.

[www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)

Образец 4	25	100		100		50		
Образец 5	25	100		100		50		

### **17. Список литературы**

См. английскую версию инструкции.

## **Информация для заказа**

**119991, Москва, Ленинские горы,  
ЗАО БиоХимМак  
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),  
9392421, 9395808,  
факс (495) 939-09-97.  
e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)**

IBL, RE53031 Proinsulin ELISA

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва,

e-mail: [info@biochemmack.ru](mailto:info@biochemmack.ru)

Версия: 2 / 2003-12-18

Ленинские горы, тел. (495) 647-2740  
(многоканальный),

9392421, 9395808, факс (495) 939-09-97.

[www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru)