

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

625-300, Luteinizing Hormone (LH) Test System

Каталог. № : 625-300

Количество : 96

Производитель: **Monobind (США)**

Методика от 06-11-2012

Версия 3



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

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Лютеинизирующего Гормона в человеческой сыворотке.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) – гликопротеин, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой 30000 Д. α -субъединица сходна с такими же субъединицами других гипофизарных гормонов: ФСГ, ТТГ и ХГ, при этом β -субъединица уникальна. β -субъединица обеспечивает специфическую активность молекулы. α -субъединица состоит из 89 аминокислотных остатков, β -субъединица содержит 129 аминокислотных остатков. Содержание углеводного компонента в молекуле колеблется между 15 и 30%. Клиническая значимость исследования ЛГ заключается в установлении гомеостаза фертильной регуляции в оси гипоталамус-гипофиз-гонады (1,2). Можно добавить, что импульс развитию методологии исследования ЛГ дала технология экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), позволившая преодолеть некоторые виды бесплодия. Для осуществления задач, связанных с ЭКО, потребовались простые и быстрые иммуноферментные методы анализа ЛГ.

В этом методе калибраторы ЛГ, образцы пациента или контроли сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляются биотинилированные моноклональные антитела и фермент-меченые антитела (направленные против специфичных и разных эпитопов ЛГ), и реагенты перемешиваются. Реакция между различными антителами к ЛГ и нативным ЛГ образует сэндвичевый комплекс, который связывается со стрептавидином в ячейках.

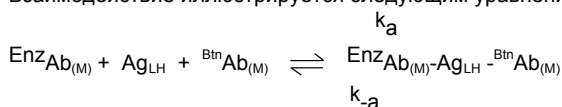
После завершения необходимого инкубационного периода антитела, связанные с конъюгатом, отделяются от несвязавшегося конъюгата промывкой. Активность фермента на поверхности ячеек измеряется реакцией с подходящим субстратом.

Использование стандартов ЛГ с известными различными концентрациями позволяет построить калибровочную кривую. Концентрации ЛГ в неизвестных образцах находят по этой калибровочной кривой.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Имуноферментный анализа (тип 3)

Настоящие реагенты, необходимые для иммуноферментного определения, включают в избытке высокоаффинные и специфичные антитела (фермент-меченые и биотинилированные) для специфического распознавания различных эпитопов, и естественный антиген. В процессе анализа на поверхности микроячеек взаимодействуют сорбированный в ячейках стрептавидин и добавляемые биотинилированные анти-ЛГ антитела. При смешивании биотинилированных анти-ЛГ моноклональных антител, ферментного конъюгата и сыворотки, содержащей естественный антиген, между нативным антигеном и антителами происходит реакция без конкуренции или пространственных затруднений с образованием растворимого сэндвич-комплекса. Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



$\text{B}^{in}\text{Ab}_{(M)}$ = биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество)

Ag_{LH} = нативный антиген (переменное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}$ = фермент-меченые моноклональные антитела (избыточное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)-\text{Ag}_{LH}-\text{B}^{in}\text{Ab}_{(M)}}$ = сэндвичевый комплекс антиген-антитело

k_a = константа скорости ассоциации

k_{-a} = константа скорости диссоциации

Одновременно в ячейках образуется комплекс при реакции высокоаффинного взаимодействия стрептавидина и биотинилированных антител. Это взаимодействие иллюстрируется так:

$\text{EnzAb}_{(M)-\text{Ag}_{LH}-\text{B}^{in}\text{Ab}_{(M)}} + \text{стрептавидин}_{C.W.} \Rightarrow \text{имм. Комплекс стрептавидин}_{C.W.} = \text{стрептавидин, иммобилизованный на ячейках}$
Имм.(обилизованный) комплекс = сэндвич-комплекс, связанный с твердой поверхностью.

После достижения равновесия фракция, связанная с антителами, отделяется от несвязавшихся антигенов декантацией или аспирацией и последующей промывкой. Активность фермента во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

A. Калибраторы ЛГ - 1 мл/флакон - значки A-F

6 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями ЛГ 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) и 200 (F) мМЕд/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.

Замечание: Калибраторы на основе человеческой сыворотки прокалиброваны по Международному стандарту ВОЗ IRP 68/40.

B. Конъюгат фермент-ЛГ – 13 мл/флакон - значок

Один флакон, содержащий фермент-меченые аффинно очищенные мышинные моноклональные антитела и биотинилированные моноклональные мышинные IgG в буфере, краситель и консервант. Хранить при 2-8°C.

C. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок

Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запечатанный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.

D. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок

Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.

E. Субстрат A - 7 мл/флакон - значок S^A

Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.

F. Субстрат B - 7 мл/флакон - значок S^B

Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.

G. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок

Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.

H. Инструкция к набору.

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

Замечание 3: Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозатор на 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
4. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
5. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
6. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
7. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
8. Таймер
9. Контрольные материалы

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*
Не для внутреннего или наружного использования на людях
или животных**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что

рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служит сыворотка крови. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.020 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

1. Буфер для промывок

Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.

2. Рабочий субстратный раствор

Смешайте Субстраты, вылив содержимое коричневого флакона с Субстратом А во флакон Субстрат В. Закройте смесь желтой крышкой для легкой идентификации. Перемешайте смесь и подпишите флакон «Рабочий раствор субстрата». Раствор хранится при 2-8 °C.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
2. Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте по 0.100 мл (100 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
5. Накройте микропланшет пластиковой пленкой и инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
7. Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
8. Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
10. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
11. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине

волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации ЛГ в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

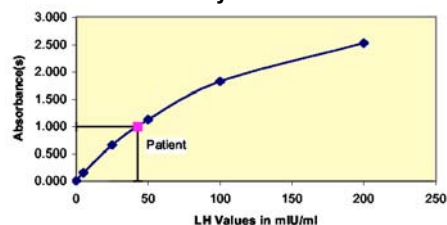
1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации ЛГ в мМЕд/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите концентрации ЛГ в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 1.005 пересекает стандартную кривую при 42.7 мМЕд/мл (см. рис. 1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация мМЕд/мл
Калибратор А	A1	0.009	0.009	0
	B1	0.009		
Калибратор В	C1	0.161	0.162	5
	D1	0.163		
Калибратор С	E1	0.677	0.662	25
	F1	0.647		
Калибратор D	G1	1.155	1.130	50
	H1	1.106		
Калибратор E	A2	1.852	1.825	100
	B2	1.797		
Калибратор F	C2	2.556	2.534	200
	D2	2.512		
Контроль 1	E2	0.077	0.072	1.9
	F2	0.067		
Контроль 2	G2	0.582	0.575	20.5
	H2	0.568		
Образец	A3	0.998	1.005	42.7
	B3	1.112		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1



11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Калибратора F должна быть ≥ 1.3
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
4. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
5. Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
6. Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.

7. Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
8. Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
9. Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
10. Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
11. Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
12. Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/СЕ, для данного и других устройств, произведенных *Monobind Inc.*, может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

1. **Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
2. Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализам.
3. Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
4. Производитель не несет ответственности за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
5. Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции, ожидаемые значения при использовании данного метода приведены в таблице 1:

ТАБЛИЦА 1
Ожидаемые значения для ЛГ, мМЕд/мл

Женщины	
Фолликулярная фаза	0.5 - 10.5
Середина цикла	18.4 - 61.2
Лютеиновая фаза	0.5 - 10.5
Постменопауза	8.2 - 40.8
Мужчины	
	0.7 - 7.4

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (мМЕд/мл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Уровень 1	20	1.4	0.10	6.8 %
Уровень 2	20	21.6	0.85	3.9 %
Уровень 3	20	58.3	2.10	3.6 %

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (мМЕд/мл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Уровень 1	20	1.6	0.12	7.8 %
Уровень 2	20	21.5	2.32	10.8 %
Уровень 3	20	55.4	5.34	9.6 %

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 0.003 мМЕд/лунку. Это эквивалентно образцу с концентрацией 0.054 мМЕд/мл для данного набора. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (мМЕд/мл) плюс 2 σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным радиоиммуноанализом методом. Использовались образцы от нормальных и беременных женщин. Общее число образцов было 110. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для данного метода в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	14.8	Y= 0.081 + 0.93 (x)	0.989
Метод сравнения	15.1		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Перекрестные реакции антител к ЛГ с различными веществами оценивались добавлением влияющих веществ в сыворотку в различных концентрациях. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой влияющего вещества и дозой ЛГ, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Перекрестная реактивность
Лутропин (ЛГ)	1.0000
β -субъединица ЛГ	1.0800
Фоллитропин (ФСГ)	< 0.0001
ХГЧ	< 0.0001
ТТГ	< 0.0001



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