



## Набор ИФА для определения в человеческой сыворотке ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

Каталог. № : E-HLH-1P  
Количество : 96  
Производитель: Dima Diagnostika (Германия)

Методика от 11-2005

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

### ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- Длина волны - фильтр измерения: 450 нм
- Время инкубации - 80 минут при 37°C (10/60/10)
- Ферментный конъюгат - HRP (Пероксидаза Хрена)
- Субстрат - ТМВ (3,3,5,5 – Тетраметилбензидин)
- Образец - Сыворотка или Плазма
- Стабильность образцов - неразбавленных: 2 дня при 2-8°C; для более длительного хранения при - 20 °C
- Диапазон калибровки - 0 – 200 мЕд./мл
- Чувствительность - 1.0 мМЕ/мл

### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. Микропланшет, 12x6x8 полосок (с разделяющимися лунками); 96 лунок, покрытых анти-моноклональным ЛГ. **Готов к использованию.**
2. Калибраторы (5), 5 флаконов по 0,4 (0,2) мл. Концентрации: 0; 5; 20; 75 и 200 мЕд./мл. **Готовы к использованию.**
3. Ферментный конъюгат, 1 флакон 12 (6) мл анти-моноклонального ЛГ HRP конъюгата. **Готов к использованию.**
5. Раствор Субстрата, 1 флакон ТМВ-субстрата, 12 (6) мл, 0,25 г/л. **Готов к использованию.**
6. Стоп Раствор, 1 флакон серной кислоты 0,15 моль/л, 12 (6) мл. **Готов к использованию.**

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Неионизированная или дистиллированная вода.
2. Объемные пробирки и подставки.
3. Подставки для промывки
4. Микропипетки от 25 до 1000 мкл.
5. Многоканальная пипетка.
6. Этаповый координатный стол.
7. Микропланшетный фотометр, способный проводить измерения при (450 нм ± 10 нм). Если доступен фотометр с двойной длиной волны, контрольный фильтр нужно установить на 600-690 нм.
8. Автоматический микропланшетный вошер, способный к распределению 200-300 мкл.

### ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

ЛГ IEMA анализ основан на одновременном связывании человеческого ЛГ с двумя моноклональными антителами, одним, иммобилизованным на микролунках планшета, другим, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP). После инкубации связанное/свободное отделение проводится простой промывкой твердой фазы, затем добавляется раствор субстрата (ТМВ). После того, как прошло соответствующее время для максимального развития цвета, ферментная реакция останавливается и определяется абсорбция. ЛГ концентрация в образце вычисляется исходя из ряда стандартов. Интенсивность цвета пропорциональна концентрации ЛГ в образце.

### ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА

Данный ELISA анализ – непрямой твердофазный иммуноанализ, основанный на принципе сэндвича. Микролунки покрыты моноклональным анти-ЛГ, с последовательным блокированием неактивных краев, чтобы сократить неспецифическое связывание.  
**Этап 1** ЛГ антигены, присутствующие в калибраторах и образцах пациентов привязываются к покрытому антителу.

**Этап 2** Комплекс антиген-антитело вступает в реакцию с ферментом (HRP), меченным моноклональным анти-ЛГ конъюгатом, который ведет к разделению ЛГ между антителом твердой фазы и ферментным конъюгатом.

**Этап 3** Фермент преобразовывает добавленный субстрат (ТМВ), создав цветной раствор.

**Этап 4** Интенсивность изменения цвета, которое пропорционально концентрации антител в образцах считается микропланшетным фотометром при 450 нм. Результаты выражены в мМЕ/мл.

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна установить свои собственные стандартные диапазоны, основанные на пациентах. Значения ЛГ сыворотки или плазмы определены в следующих диапазонах:

Ж: Фолликулярная фаза	1.5 – 8.0	мМЕ/мл
Лютеинизирующая фаза	0.2 – 6.5	мМЕ/мл
Фаза овуляции	5.0 – 24.0	мМЕ/мл
Менопауза	16.0 – 90.0	мМЕ/мл

### РЕАГЕНТЫ

#### Хранение

- Хранить все реагенты при 2° - 8°C. Не замораживать!

#### Подготовка

- Покрытые микролуночные полоски только для одноразового использования.
- Калибраторы, раствор субстрата, ферментный конъюгат и стоп раствор готовы к использованию и не нуждаются в разбавлении.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. ВНИМАНИЕ: Не существует методов тестирования, на 100% гарантирующих отсутствие компонентов вируса Гепатита Б, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV), или других инфекций. Поэтому все продукты, содержащие компоненты человеческой крови должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Поэтому при работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности, установленные в лабораторной практике.
2. Избегайте контакта кожи со Стоп-раствором. Это может вызвать раздражения и ожоги.
3. Немедленно после использования закройте реагенты крышками. Не путайте крышки от реагентов.
4. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид соды, не должны использоваться в ферментной реакции.
5. Только для диагностики ин-витро.
6. Не используйте в исследовании компоненты из наборов разных партий.

### ЗАБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Только образцы сыворотки или плазмы необходимо использовать в этой процедуре. Не нужно пациентам сдавать кровь натощак, и не нужны никакие специальные подготовки.
2. Высокогемолизированные, липемические и биологически зараженные образцы, могут мешать проведению анализа и не должны использоваться. Ни билирубин, ни гемолиз не имеют существенного влияния на процедуру.
3. Образцы необходимо хранить максимум **до 2 дней** при 2-8°C. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить до -20°C до исследования. Образцы с концентрацией более 200 мЕд./мл необходимо разбавить разбавителем образца.
4. См. Подготовка Образцов.

### ПРОЦЕДУРА

#### Процедурные замечания

1. Перед исследованием все реагенты и образцы должны иметь комнатную температуру. Все реагенты перемешивать без образования пены.

- После начала теста все этапы должны быть завершены без перерывов.
- Для каждой пробы использовать новые одноразовые наконечники пипеток.
- Абсорбция исходит из времени инкубации и температуры. До начала исследования рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить требуемое количество лунок, и т.д., чтобы пройти все этапы исследования без остановки.

#### Подготовка образцов

Обычно нет необходимости в разбавлении; разбавьте образцы с концентрациями выше 200 мМЕ/мл Стандартом А 1:1.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Используйте протокол размещения образцов в лунках (см. Рисунок ниже), где используются **5 калибраторов** (стандартов) (А-Е) и **1 бланк**. Пользователь может провести на выбор анализ в паре:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	B	SD	P3									
b	SA	SE	P4									
c	SA	SE	P4									
d	SB	P1	P..									
e	SB	P1	P..									
f	SC	P2										
g	SC	P2										
h	SD	P3										

Кал.	Конц.
	мМЕ/мл
SA	0
SB	5
SC	20
SD	75
SE	200

- Возьмите требуемые лунки из сумки и верните неиспользованные полоски в запечатанную сумку в холодильнике. Безопасно разместите микролунки в дополнительном держателе.
- Пипеткой внесите по **25 мкл калибратора и образца** в лунки. Инкубируйте **10 минут при комнатной температуре**.
- Добавьте **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку планшета кроме бланка, накройте планшет и инкубируйте **60 минут при комнатной температуре**.
- Внесите **200-300 мкл** дистиллированной воды, декантируйте или аспирируйте содержимое лунок. Повторите процедуру **4 раза, в сумме – 5 раз**.
- Внесите **100 мкл раствора субстрата** в каждую микролунку в том же порядке и времени как для ферментного конъюгата и бланка.
- Инкубируйте **10 минут** при комнатной температуре в темноте.
- Добавьте **100 мкл стоп раствора** в каждую микролунку, в том же порядке и времени как для раствора субстрата.
- Используя микропланшетный фотометр, считайте абсорбцию каждой микролунки при **450 нм относительно бланка**. Образовавшийся цвет стабилен, по крайней мере 30 мин. Считайте оптическую плотность в течении этого времени.

#### ОЦЕНКА АНАЛИЗА

Средняя абсорбция и процентное соотношение.

- Вычислите средние показатели абсорбции (Em), соответствующие единичным точкам стандартной кривой и показатели каждого образца.
- Отнимите значение средней абсорбции нулевого стандарта от значений средней абсорбции стандартов и образцов.
- Нарисуйте стандартную кривую на графопостроительной бумаге выводя значения абсорбции стандарта против соответствующей концентрации ЛГ.
- Считайте концентрации ЛГ калибраторов и образцов.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Анализ не должен проводиться с высокогемолизированными, биологически загрязненными или липемическими образцами. Этот метод нужно использовать только для анализа образцов человеческой сыворотки.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чувствительность

Минимально определенная концентрация человеческого ЛГ в данном анализе составляет 1,0 мМЕ/мл.

##### Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность:

β - hCG	100,0 %
HCG	4,0 %
hLH	100,0 %
hFSH	3,0 %
hTSH	0,02 %

##### Точность

###### Внутрирестовое отклонение

Образец	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Среднее ЛГ (мМЕ/мл)	3,6	21,2	48,2
Стандартное отклонение	0,21	1,15	3,02
Коэффициент вариации (%)	5,8	5,4	6,25

###### Междурестовое отклонение

Образец	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Среднее ЛГ (мМЕ/мл)	3,4	20,6	51,3
Стандартное отклонение	0,26	1,51	4,33
Коэффициент вариации (%)	7,6	7,2	8,44

##### Восстановление

Среднее восстановление составило 99,5 % по соотношению к первичным концентрациям.

Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
8.5	8.8	103.5
14.6	13.7	93.8
45.2	43.8	96.9
68.8	73.4	106.7
125.1	120.9	96.6

##### Линейность

В линейном исследовании были последовательно разбавлены нулевым стандартом два образца пациентов. Среднее восстановление составило 102,1%.

Пациент	Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
<b>1</b>		86.4	
Разбавл. 1 / 2	43.2	44.1	102.8
Разбавл. 1 / 4	21.6	22.1	102.3
Разбавл. 1 / 8	10.8	10.4	96.2
<b>2</b>		92.8	
Разбавл. 1 / 2	46.4	45.5	98.0
Разбавл. 1 / 4	23.2	24.0	103.4
Разбавл. 1 / 8	11.6	10.8	93.1

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

В этом анализе эффект «крюка» или «петли» не был обнаружен в пределах до 4000 мМЕ/мл ЛГ.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)