



## Набір ІФА для визначення в сироватці людини ЛЮТЕЇНІЗУЮЧОГО ГОРМОНУ (ЛГ)

Каталог. № : KP7IW  
Кількість : 96  
Виробник : Radim (Італія)

Методика від 10-2003  
Версія 3

Увага: основою при проведенні дослідження є оригінал інструкції.

### ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

#### ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір базується на імуноферментометричному аналізі (EIMA). В ньому використовуються два різні моноклональні антитіла до ЛГ, одними покриті лунки, а інші кон'юговані до пероксидази хрому (HRPO). Впродовж інкубації ЛГ в калібраторах і зразках водночас зв'язується з двома моноклонами, утворюючи комплекс «сендвіч». Після цієї інкубації весь нез'язаний матеріал видаляється циклом аспірації/промивання. Залишкова ферментативна активність в лунках прямо пропорційна концентрації ЛГ в калібраторах і зразках, та відобразиться при інкубації твердої фази з розчином хромогену (ТМБ) в субстратному буфері. Колориметричне зчитування здійснюється за допомогою спектрофотометра при 450 нм.

#### РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ: ПРИГОТУВАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- реагентів достатньо для 96 лунок
- зберігати набір при 2-8°C
- термін придатності кожного реагента вказаний на етикетці флакону.

1. **Покритий мікропланшет:** 96 лунок, покритих моноклональними антитілами до ЛГ. Невикористані лунки необхідно зберігати при 2-8°C в наявному поліетиленовому пакеті та герметично закритими.
2. **Калібратори:** 6 фл. ЛГ в основі сироватки, ліофілізовані. Концентрації: 0, 2, 10, 40, 100 та 200 мМО/мл. Консервант: неоміцин і тімеросал (<0,05%). Розвести калібратори 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C впродовж 1 тижня, для довшого зберігання слід заморозити до -20°C.  
**ПРИМІТКА:** див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
3. **Ферментний кон'югат (концентрований),** 1 фл. (1,3 мл) моноклональних антитіл до ЛГ, кон'югованого пероксидазою хрому (HRPO) в Tris HCl, BSA та стабілізаторах. Консервант: неоміцин. Перед використанням додати 1,2 мл ферментного кон'югату до флакону з розчинником кон'югату (12 мл) або розбавити кон'югат 1:11 розчинником кон'югату (виходячи з необхідного об'єму для проведення аналізу) і ретельно перемішати. Зберігати розведений кон'югат при 2-8°C впродовж 2 місяців; для довшого зберігання слід заморозити до -20°C.
4. **Розчинник кон'югату:** 1 фл. (12 мл) Tris-HCl з BSA та стабілізаторами. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Готовий до використання.
5. **Контрольна сироватка:** 1 фл. ЛГ в основі сироватки. Ліофілізована. Консерванти: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Розвести 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C 1 тиждень; для довшого зберігання заморозити до -20°C.  
**ПРИМІТКА:** див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
6. **Промивний розчин (концентрований):** 1 фл. (50 мл) PBS і Tween 20. Консервант: тімеросал (<0,05%). Розвести вміст флакону дистильованою водою до 1000 мл. У випадку нерозчинених кристалів, обробіть розчин, помістивши флакон на декілька хвилин в інкубатор при 37°C. Зберігати розведений промивний розчин при 2-8°C впродовж 1 місяця.
7. **Хромоген:** 1 фл. (15 мл) ТМБ із цитрат-фосфатним буфером і DMSO. Рідкий. Готовий до використання.
8. **Субстратний буфер:** 1 фл. (15 мл) цитрат-фосфатного буферу і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Рідкий. Готовий до використання.
9. **Блокуючий реагент:** 1 фл. (14 мл) N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Готовий до використання.

**ПРИМІТКА:** в скляному посуді провести розведення 1+1 рівних порцій хромогену та субстратного буферу. Уникати прямого попадання світла впродовж 1 год. з часу приготування.

- Адгезивна плівка для планшети
- Поліетиленовий пакет

#### МАТЕРІАЛИ, ЩО ВИМАГАЮТЬСЯ АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Регульовані, автоматичні мікро піпетки зі змінними насадками.
- Мірна колба.
- Мікропланшетний струшувач на 1200 об/хв..
- Помпа для аспірації або автоматизований пристрій для промивки лунок.
- Мікропланшетний спектрофотометр з абсорбцією в межах 0-3,0 А інтервалу при 450 нм.
- Міліметровий графічний папір.
- Дистильована вода.

#### АВТОМАТИЗОВАНИЙ АНАЛІЗ

- даний аналіз може бути проведений з використанням автоматизованого апарату для ELISA наборів на мікро планшетах.
- Виробник гарантує використання даного набору в автоматизованих апаратах компанії RADIM і/або SEAC.
- При використанні інших автоматизованих мікропланшетних апаратів, відповідальність за правильність аналізів ELISA наборів у них несе користувач.

#### ПОПЕРЕДЖЕННЯ та ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Не змішуйте реагенти різних партій.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- використовуйте ретельно очищений лабораторний посуд, вільний від забруднення іонами металів або окислюючі речовин.
- Використовуйте дистильовану воду, що зберігається в ретельно очищених ємкостях.
- уникайте забруднення зразків. З цією метою для кожної зразки та реагента використовуйте змінні насадки.
- Виконуйте чітко вимоги щодо інкубації як описано в розділі «Процедура аналізу».

**Для того щоб уникнути особистого зараження та забруднення середовища, дотримуйтесь наступних застережень:**

- Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.

- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте, не пийте, не курить і не користуйтеся косметикою в процесі аналізу.
- Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів. У їх випадку ретельно промийте 3% розчином гіпохлориду натрію. Будь-який очищуючий матеріал такого складу слід вважати потенційно інфекційним та дотримуватись вимог по його утилізації.

#### ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Аналіз може проводитись на зразках сироватки. Високо ліпемічні або гемолізовані Зразки необхідно видалити. Зберігати при 2-8<sup>0</sup>С 1-2 дні. Для довшого зберігання Зразки повинні бути заморожені до -20<sup>0</sup>С. Уникати повторного розморожування/заморожування.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ\*

- Доведіть всі реагенти та зразки до кімнатної температури.
  - Перед використанням перемішайте перевертаючи зразки.
1. Приготувати лунки для: бланку, калібраторів, контрольної сироватки і зразків.
  2. Додати у відповідні лунки по **100 мкл** кожного калібратора, контрольної сироватки і зразка.
  3. Додати в кожну лунку по **100 мкл** ферментного кон'югату, крім лунки бланку.
  4. Накрити мікропланшет адгезивною плівкою (постачається в наборі) та легко змішати.
  5. Інкубувати лунки впродовж **60 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.).
  6. Зняти адгезивну плівку і ретельно аспірувати зі всіх лунок інкубаційну суміш.
  7. Промити лунки **4 рази 350 мкл** розведеного промивного розчину. Спірувати всю рідину із лунок.
  8. Розкапати у всі лунки по **200 мкл** розчину хромогену-субстрату (див. розділ Реагенти);
  9. Інкубувати лунки впродовж **15 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.), уникати прямого попадання світла.
  10. Розкапати у всі лунки по **100 мкл** блокуючого реагенту.
  11. Зчитати абсорбцію лунок за допомогою біхроматичного спектрофотометра при **450** з референтною довжиною хвилі **620 нм** (налаштовуючи апарат на нуль лункою бланку). Зчитування необхідно завершити впродовж **1 год** після завершення аналізу.

\*При використанні в процедурі автоматизованих апаратів компаній RADIM і/або SEAC, зсилайтесь на відповідні інструкції.

#### СХЕМА АНАЛІЗУ (Див. ст.. 23)

#### ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використовуючи автоматичні апарати SEAC і/або RADIM для мікропланшетів спектрофотометричне зчитування виконуватиметься автоматично при 3 різних довжинах хвилі: 450, 405 і 620 нм, таким чином розширюючи амплітуду кривої.

Вивести калібрувальну криву на міліметровому графічному папері, виводячи концентрацію калібратора (вісь абсцис) проти абсорбції, отриманої для кожного калібратора (вісь ординат). Відповідні концентрації ЛГ в мМО/мл отримуються шляхом інтерполяції абсорбції кожного зразка на калібрувальну криву.

#### ПРИКЛАД ОБЧИСЛЕННЯ

Нижчевказані значення слід розглядати в якості прикладу та не повинні використовуватися замість даних дослідження.

Опис	Абсорбція	ЛГ
Калібратор 0 мМО/мл	0,009	
Калібратор 2 мМО/мл	0,078	
Калібратор 10 мМО/мл	0,390	
Калібратор 40 мМО/мл	1,583	
Калібратор 100 мМО/мл	2,691	
Калібратор 200 мМО/мл	5,200	
Зразок	0,599	15,3 мМО/мл

#### ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Значення, вказані нижче, є орієнтовними. Рекомендується щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон норми.

Жінки:	
- фолікулярна пауза	1,5 – 13 мМО/мл
- пік проміжного циклу	12 – 70 мМО/мл
- лютеальна фаза	0,5 – 17 мМО/мл
- менопауза	12 – 75 мМО/мл
Чоловіки	1,0 – 9,5 мМО/мл

#### Критерії достовірності

Перед початком проведення обчислення результатів переконайтеся, що концентрація контрольної сироватки знаходиться в межах вказаних в листку контролю якості.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

##### Специфічність

Даний метод показав наступні типи перехресної реактивності:

Аналіт	Концентрація	ЛГ мМО/мл
ЛГ (1-й IRP 68/40)	40 мМО/мл	0,35
	200 мМО/мл	0,60
	1000 мМО/мл	2,50
ТСГ (2-й IRP 80/558)	10 мкМО/мл	0,80
	100 мкМО/мл	1,20
	1000 мкМО/мл	2,90
ЛХГ (1-й IRP 75/537)	100 мМО/мл	0,40
	1000 мМО/мл	0,40
	10000 мМО/мл	0,35
	100000 мМО/мл	0,00

**Чутливість**

Чутливість була визначена на основі калібрувальної кривої і виражена як мінімальна доза, вказуючи на значну різницю із нульовим калібратором (середн. значення + 2 СВ). Ця доза складає **0,25 мМО/мл**.

**Точність**

Точність була оцінена виходячи із варіативності в межах процедури на між процедурами в 3 сироватках при різних концентраціях ЛГ.

**В межах процедури (повторюваність)**

Сироватка	Середн.	+/- (мМО/мл)	СВ	КВ %	К-сть реплікатів
A	1,70		0,14	8,30	10
B	16,60		0,43	2,60	10
C	72,30		1,91	2,64	10

**Між процедурами (відтворюваність)**

Сироватка	Середн.	+/- (мМО/мл)	СВ	КВ %	К-сть аналізів
A	2,01		0,19	9,45	10
B	17,80		1,60	8,98	10
C	60,70		2,92	4,80	10

**Достовірність**

Достовірність методу була перевірена тестами на відновлення та паралелізм.

**Тест на відновлення**

Відомі послідовні значення ЛГ були додані до об'єднання сироваток норми та досліджені.

Додано (мМО/мл)	Очікувані (мМО/мл)	Отримані (мМО/мл)	Відновлення %
P	—	2,6	—
P + 9,1	11,7	11,0	94
P + 16	18,6	18,0	97
P + 35	37,6	38,5	102
P + 80	82,6	79,5	69
P + 167	169,6	158,0	93

**Дослідження на паралелізм**

Сироватка з високим вмістом ЛГ була досліджена при різних розведеннях нульовим калібратором.

Розбавлення	Очікувані (мМО/мл)	Отримані (мМО/мл)
S нерозведений	—	38,5
1:2	19,2	20,0
1:4	9,6	10,4
1:8	4,8	5,0
1:16	2,4	2,5

**«Хук-ефект» високої дози**

Кожного разу, коли зразки з дуже високими концентраціями антигена аналізуються нерозведеними в поетапному "сендвіч"- методі, як в цьому наборі, «хук-ефект» може дати значення концентрацій очевидно нижчі, ніж фактичні значення. В цьому наборі на спостерігається «хук-ефект» в концентрації до 2000 мМО/мл.

**ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ**

Результати аналізу повинні ретельно інтерпретуватись і бути підтверджені клінічними оцінками і подальшими діагностичними дослідженнями.

**ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:**

ПМП «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97, м.  
Івано-Франківськ, 76005  
тел.: (0342) 775122 факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)