

**НАБОР ЧЛГ [ ] IRMA**

(Номер по каталогу: RK-750CT)

Система <sup>125</sup>I-ЧЛГ IRMA позволяет проводить количественное определение лютеинизирующего гормона человека (ЧЛГ) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение ЧЛГ может проводиться в диапазоне 0-150 мМЕ/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 100 мкл.

**Введение**

Лютеинизирующий гормон человека (лютропин или ЛГ) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 30000, секретируемый аденогипофизом. Как и другие гликопротеиновые гормоны (ЛГ, ТСГ и ГКГ), ЧЛГ содержит две различные субъединицы, α-и β-цепь, связанные нековалентно. Первичные структуры α субъединиц ЧЛГ и вышеуказанных гормонов практически идентичны, в то время как их β-субъединицы различны. β-субъединицы отвечают за иммунологическую и биологическую специфичность этих гормонов.

Синтез и высвобождение ЧЛГ стимулируются гонадотропин-релизинг гормоном (ГнРГ) гипоталамуса, тогда как стероиды яичников, секретируемые желтым телом, контролируют дальнейшую секрецию ЧЛГ по принципу отрицательной обратной связи.

Измерение концентрации ЧЛГ является важной частью исследований нарушений в системе гипоталамус - гипофиз - половые железы. Для того, чтобы дифференцировать дисфункцию гипоталамуса и гипофиза рекомендуется определить значение обоих гормонов: ЧЛГ и ЧФСГ.

**Принцип метода**

Технология, применяемая в системе иммунорадиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченое <sup>125</sup>I, связывается с эпитопом молекулы ЛГ, которая отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело – антиген – сигнальное антитело, также известного как «сандвич».

В течение инкубационного периода продолжительностью 1 час при непрерывном помешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционную смесь извлекают, пробирки тщательно промывают и производят замер их радиоактивности в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество ЧЛГ, может быть определена искомая концентрация ЧЛГ в образцах пациента.

**Содержание набора**

1. 1 флакон (21 мл) МЕТКИ, готовой к использованию. Содержит около 740 кБк <sup>125</sup>I-анти-ЧЛГ и иммобилизованные анти-ЧЛГ в буфере с красным красителем и 0.1% NaN<sub>3</sub>.

2. 6 флаконов СТАНДАРТОВ (6 x 1.0 мл), содержащих (S<sub>1</sub>-S<sub>6</sub>) 0, 0.4, 2.0, 10, 40, 150 мМЕд/мл ЧЛГ (WHO 2<sup>nd</sup> IS 80/552 Int.Std.) в бычьей сыворотке, с 0.1% NaN<sub>3</sub>. См.

*Приготовление реактивов*

3. 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ. Лиофилизированная сыворотка крови человека с 0,1% NaN<sub>3</sub>. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества. См. *Приготовление реактивов*.

4. 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию 2x50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованные в пластиковые коробки.

5. 1 флакон (20 мл) КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА, с 0.2% NaN<sub>3</sub>. См. *Приготовление реактивов*.

Сертификат качества

Листок-вкладыш

**Необходимые материалы, инструменты и оборудование**

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (100, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревая мешалка, шейкер, полимерная пленка абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

**Рекомендуемые инструменты и оборудование**

автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром 1л (вместо 2мл пипетки)

**Сбор и хранение образцов**

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (- 20 °С). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Образцы сыворотки с концентрацией ЧЛГ выше, чем в самом концентрированном стандарте, следует разбавить и проанализировать еще раз.

**Приготовление реактивов, хранение**

Для получения 720 мл промывочного раствора добавьте 20 мл концентрата

промывочного буфера к 700 мл дистиллированной воды. Приготовленный раствор хранить при температуре 2-8°С до окончания срока годности НАБОРА.

Добавьте к лиофилизированной контрольной сыворотке 1000 мкл дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте встряхиванием или взбалтыванием (следует избегать образования пены).

Убедитесь, что лиофилизат полностью растворился и дайте раствору уравновеситься при комнатной температуре в течение 20 минут. Хранить при температуре -20°С до окончания срока годности НАБОРА.

Открытые образцы следует хранить при температуре 2-8 °С. При такой температуре каждый реактив стабилен до окончания срока годности НАБОРА. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

**ВНИМАНИЕ!**

Доведите все реагенты и образцы сыворотки до комнатной температуры. Тщательно смешайте все реактивы и образцы перед использованием. Избегайте чрезмерного пенообразования.

**Процедура количественного определения**

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте два экземпляра пробирок с покрытием для каждого из стандартов (S<sub>1</sub>-S<sub>6</sub>), контрольной сыворотки и образцов.
3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы, аккуратно перемешав их, избегая вспенивания.
4. Внесите пипеткой по 100 мкл стандартов, контроля и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Для фиксации пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь или не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 200 мкл метки. Закройте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и настройте скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (мин. 600 об/мин).
7. Инкубируйте пробирки в течение 1 часа в комнатной температуре при постоянном помешивании.
8. Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.

9. Верните штатив с пробирками в прежнее положение и повторите шаг 8 еще один раз.
10. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
11. Рассчитайте концентрацию ЧЛГ в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов» или используйте для этого специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Все -го	Стандарт	Конт- роль	Обра- зец
Стандарт		100		
Контроль			100	
Образец				100
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывоч- ный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывоч- ный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Измерьте уровень радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

## Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (CPM) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитать нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$B/T(\%) = \frac{S_{2.6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_1 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график В/Т (%) для каждого стандарта в соответствии с соответствующей концентрации ЧЛГ.

Определите концентрацию ЧЛГ в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных прикладных программ автоматической обработки данных, в данном случае можно использовать логит-преобразование или аппроксимацию данных с помощью сплайн-функций.

Так же доступна автоматизированная система обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Количество cpm	Среднее значение cpm	В/Т %
T	306942 306700	306821	-
S1	87 104	96	0,03
S2	699 734	717	0,23
S3	2957 2901	2929	0,95
S4	14065 14110	14088	4,6
S5	54103 54115	54109	17,6
S6	175324 175144	175234	57,1
C	11538 11337	11438	3,7

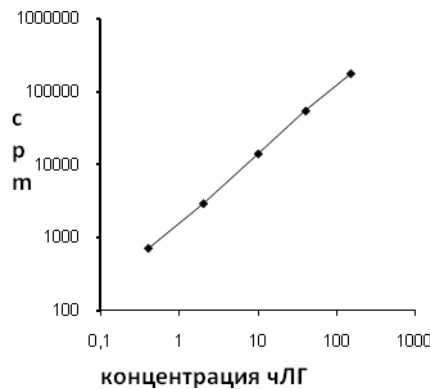


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для подсчета значений образцов)

## Характеристика количественного определения

### Типичные параметры количественного определения

NSB/T < 1 < 0,1 %

### Чувствительность

Значение предела обнаружения, которое составило 0,05 мМЕ/мл, было получено в результате тестирования 20 копий нулевого стандарта. Чувствительность была определена как концентрация, соответствующая сумме среднего значения cpm и его двух стандартных отклонений.

### Специфичность

При нормальных физиологических концентрациях не было выявлено перекрестной реактивности с ЧФСГ и ЧТСГ.

2000 мМЕ/мл ЧЛГ дает повышение концентрации ЧЛГ примерно на 3,5 мМЕ/мл.

### Точность

Для определения внутрисубъектной вариабельности было проанализировано 4 образца, по 15 повторов. Ниже представлены полученные значения.

Образец	Количество повторов	Среднее значение	CO	CV %
1	15	52,3	0,4	0,7
2	15	29,9	0,3	1,0
3	15	6,6	0,1	1,4
4	15	0,2	0,02	9,3

## Воспроизводимость

Для определения межсубъектной вариабельности 4 образца измерялись дважды в ходе 15 независимых анализов, проведенных 2 исполнителями с помощью наборов из разных партий. Ниже представлены полученные значения.

Образец	Количество повторов	Среднее значение	CO	CV %
1	15	0,2	0,03	12,1
2	15	6,5	0,2	3,1
3	15	29,2	0,9	3,1
4	15	51,8	1,4	2,8

## Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным уровнем ЧЛГ. Средний процент восстановления для 9 образцов сыворотки с пиковыми значениями ЧЛГ на 3 уровнях был:  $98.6 \pm 4.3$  (среднее  $\pm$  CO).

## Тест разведения (линейность)

Исследование 3 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Приведенная ниже формула, полученная для измеренной (Y) концентрации в сравнении с ожидаемой (X), указывает на хорошую линейность:

$$Y = 0,9688X + 0,1455 \quad R = 0,9986 \quad n = 12$$

## Ожидаемые значения

Мужчины: 1,9-9,4 мМЕ/мл

Женщины:

- овуляторный пик: 25-94 мМЕ/мл

- пред- и постовуляторный период: 0,7-9,0 мМЕ/мл

- постклимактерический период: 13-80 мМЕ/мл

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственный диапазон эталонных значений.

## Ограничения

- Реактивы, предоставленные в данном наборе, оптимизированы для измерения уровня ЧЛГ в сыворотке крови.

- Следует избегать повторного замораживания и размораживания реактивов, а также образцов, предоставленных в данном наборе.

- Не следует использовать гемолизированные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.

- При концентрациях ЧЛГ до 1000 мМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствовал. Образцы сыворотки с концентрацией выше, чем в самом

концентрированном стандарте, следует разбавить с помощью S<sub>1</sub> (0 мМЕ/мл) и провести анализ еще раз.

• Результаты исследования следует использовать совместно с другой значимой клинической информацией

## Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Опытные реакционные пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы они не перемешивались с обычными опытными пробирками. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования, а после выполнения работы класть их обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуются помечать маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

3) **Добавление промывочного буфера.** Для добавления промывочного буфера рекомендуется использовать стандартный лабораторный диспенсер со стеклянной флаконом объемом 1л и наконечником с гибкой соединительной трубкой. Если такого прибора нет в наличии, то можно использовать шприц большого объема, присоединенный к автоматической пипетке.

## Дополнительная информация

Не следует смешивать между собой или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

## Меры предосторожности

### Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

### Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуноферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1) и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования

диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) или других инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Вещества, полученные от крупного рогатого скота, были получены в странах, где не зарегистрированы случаи развития губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. Тем не менее вещества животного происхождения должны расцениваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

### Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 68 мг.

### Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Срок годности	<b>CONTROL</b>	Контроль
	Номер партии	<b>CAL</b>	Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам	<b>CT</b>	Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность	<b>TRAC</b>	Метка
	См. руководство по использованию	<b>WASHB</b>	Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики <i>in vitro</i>		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал
<b>REF</b>	Номер по каталогу		



Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)

Коммерческий e-mail: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

INSTITUTE OF ISOTOPES LTD.  
1535 Budapest. Pf.: 851.

Тел.: (36-1)392-2577,  
Факс: (36-1)395-9247

Обновлено: апрель 2016