

**НАБОР ИФА**  
**ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ**  
**КОНЦЕНТРАЦИИ**  
**ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО**  
**ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА**

**4224-16, FSH**

Каталог. № : 4224-16

Методика от 09-25-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



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

Анализ	FSH ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-200 мМЕд/мл
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	95 %
Чувствительность	2.0 мМЕд/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12-14 мес.

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Предназначен для количественного определения концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке человека.

**ВВЕДЕНИЕ**

Фолликулостимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий гормоны (ЛГ) принимают участие в регуляции роста и репродуктивной деятельности гонадальных тканей, которые синтезируют и выделяют мужские и женские половые гормоны.

ФСГ это гликопротеин, который выделяется базофильными клетками гипофиза. Гонадотропный рилизинг-гормон (ГРГ), который вырабатывается в гипоталамусе, контролирует освобождение ФСГ в гипофизе. Как и другие гликопротеины ЛГ, ТСГ и ХГЧ, ФСГ состоят из субъединиц альфа и бета. Гормоны этого типа имеют очень похожую структуру, поэтому биологические и иммунологические свойства каждого зависят от единственных в своем роде бета-субъединиц.

У женщин ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов, действуя прямо на рецепторы зернистых клеток; увеличивается под его действием фолликулярный стероидогенез и стимулируется выработка ЛГ. Выработанный ЛГ потом связывается клетками теки и стимулирует стероидогенез. При созревании фолликула происходит увеличение внутри овариальной продукции эстрадиола, таким образом стимулируя активность рецепторов ФСГ и его связывание. Так что ФСГ, ЛГ и эстрадиол задействованы в укреплении яичников и дозревании у женщин.

Уровень ФСГ растет после менопаузы, кастрации и преждевременной недостаточности яичников. Уровень ФСГ может быть нормализован назначением эстрогенов, что указывает на существование механизма обратной связи. Ненормальные взаимодействия между ФСГ и ЛГ, ФСГ и эстрогеном могут быть связаны с нервной анорексией и поликистозной болезнью яичников. Тем не менее, существуют исключения, когда при яичниковой недостаточности определяется концентрация ФСГ более 40 мМЕ/мл. Рост семенных канальцев и поддержание сперматогенеза также регулируются ФСГ. Хотя и андрогены в отличие от эстрогенов не уменьшают уровень ФСГ, тем не менее, выявляется обратная связь только с сывороточным ЛГ. С не совсем понятных причин, у мужчин с олигоспермией и азоспермией определяются увеличенные уровни ФСГ. Опухоль яичек в целом угнетают концентрацию ФСГ в плазме. Высокий уровень ФСГ в мужчин может определяться при первичной тестикулярной недостаточности и синдроме Кляйнфельтера. Увеличение его также происходит иногда при голодании, почечной недостаточности, гипертиреозидизме и циррозе.

**ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Настоящий набор является твердофазовым ферментосвязанным иммунсорбентным набором (ELISA). В анализе используется поликлональное анти-ФСГ антитело для иммобилизации твердой

фазы (микротитрационные лунки) и мышинное моноклональное анти-ФСГ антитело в растворе антитело-фермент (пероксидаза хрена) конъюгата. Исследуемый образец одновременно реагирует с антителами, в результате молекулы ФСГ будут в «сэндвиче» между твердой фазой и ферментно-связанными антителами. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, лунки промываются водой для удаления несвязанных маркированных антител. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется на 20 минут, в результате происходит развитие голубого окраса. Развитие цвета восстанавливается добавлением стоп раствора, цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация ФСГ прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце.

**МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ**

**Материалы, входящие в состав набора:**

1. Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
2. Набор референтных стандартов, содержащих 0, 5, 20, 50, 100 и 200 мМЕд/мл (ВОЗ, 2-й IRP, HMG), ФСГ человека, жидкие, готовые к использованию, 1.0 мл.
3. Ферментный конъюгат, 12 мл.
4. ТМВ субстрат, 12 мл.
5. Стоп-раствор (2N HCl), 12 мл.
6. Концентрат промывочного буфера (50x), 15 мл.

**Требуемые, но не поставляемые материалы:**

1. Точные пипетки: 0.05- 0.2 мл и 1.0 мл.
2. Сменные наконечники для пипеток.
3. Дистиллированная вода.
4. Вихревой смеситель или аналог.
5. Промокательная бумага или бумажное полотенце.
6. Бумага для построения графиков.
7. Микротитрационный планшет-ридер.

**СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Набор предназначен для работы с образцами сыворотки без добавок.

**ХРАНЕНИЕ**

Как не вскрытый, так и вскрытый набор следует хранить при 2-8°C, а планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Вскрытый набор остается стабилен до окончания срока пригодности при хранении согласно инструкции. Подходящим является микропланшетный ридер с шириной размаха 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

1. Перед использованием приведите все реагенты к комнатной температуры (18-22°C).
2. Разведите 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разведите 15 мл промывочного буфера (50x) дистиллированной водой, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешайте.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

1. Поместите нужное количество лунок с антителами в рамку для стрипов.
2. Внесите **50 мкл** стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте содержимое лунок в течении 30 секунд. Важно добиться полного перемешивания.
5. Инкубируйте пробы при комнатной температуре (18-25°C) в течении **60 мин.** Приготовьте раствор ТМБ во время этой инкубации.
6. Удалите инкубационную смесь, удалив содержимое планшет в емкость для отходов.
7. Промойте лунки промывочным буфером и вытряхнуть содержимое 5 раз.
8. Перевернуть планшет и резко постучать им по растленному листу промокательной бумаги или бумажного полотенца для удаления остатков жидкости.
9. Внесите **100 мкл** раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре в темном месте в течении 20 мин.
11. Остановите реакцию внесением **100 мкл** стоп-раствора в каждую лунку.
12. Аккуратно перемешивайте на протяжении 30 сек. до смены окраски раствора на желтую.
13. Используя ридер для планшетов, измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм на протяжении **30 мин.**

**Внимание:**

Процедура промывки имеет большое значение. При недостаточно тщательном промывании результаты будут неточными, и уровень поглощения будет завышен.

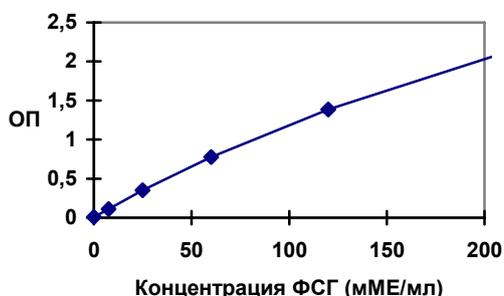
**РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Рассчитать средние значения поглощения ( $A_{450}$ ) для каждого стандарта, контрольных сывороток и образцов. На бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в мМЕд/мл на горизонтальной оси (X). С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию ФСГ в мМЕ/мл.

**Пример построения калибровочной кривой**

Результаты получают с помощью калибровочной кривой. Пример построения калибровочной кривой приведен в качестве иллюстрации. Ее нельзя использовать для расчета концентраций ФСГ в пробах.

ФСГ (мМЕд/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0,007
5.0	0,095
20.0	0,286
50.0	0,669
100.0	1,307
200.0	2,584

**ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ**

Для каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные значения уровней ФСГ, соответствующие нормальным, на основании результатов анализа статистически достоверного количества клинически охарактеризованных образцов крови. Приведенные ниже значения уровней ФСГ считать приблизительными:

Женская фолликулярная фаза	0-20 мМЕд/мл
Середина цикла	15-30 мМЕд/мл
Лютеальная фаза	0-20 мМЕд/мл
После менопаузы	40-200 мМЕд/мл
Мужчина	0-20 мМЕд/мл

Минимальная концентрация ФСГ, определяемая с помощью этого набора, составляет 2,5 мМЕд/мл.

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**I. Достоверность:** сравнение между нашим тестом и коммерчески доступным тестом предоставило следующие данные:

N = 124  
 Коэффициент корреляции = 0.980  
 Наклон = 1.01  
 Пересечение = 0.34  
 Среднее (наши наборы) = 28.8  
 Среднее (Bio-Rad) = 26.0

**II. Точность:****1) Внутрисерийная:**

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	9.17	0.54	5.93
Уровень 2	20	21.04	1.24	5.90
Уровень 3	20	50.62	2.16	4.27

**2) Между сериями:**

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	8.71	0.65	7.50
Уровень 2	20	20.09	1.82	9.04
Уровень 3	20	55.42	4.29	7.75

**III. Линейность:**

Две сыворотки пациента с серийно разводили Стандартом 0 мМЕд/мл в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 101.0 %.

Образец А			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	112.54	112.54	
2X	56.27	56.29	100.0
4X	28.14	28.58	101.6
8X	14.07	15.08	107.2
16X	7.03	7.45	105.9

Образец В			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	98.78	98.78	
2X	49.39	49.41	100.0
4X	24.69	23.31	94.4
8X	12.35	12.03	97.4
16X	6.17	6.23	101.0

Среднее восстановление: 98.2 %

**IV. Восстановление**

Различные образцы сыворотки с известным уровнем FSH смешивались и анализировались в дубликатах. Среднее восстановление составило 98.7 %.

Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
5.03	5.09	101.1
17.41	17.47	100.3
29.76	28.55	95.9
34.15	33.05	96.8
39.78	41.82	105.1
52.83	49.25	93.2

Среднее восстановление: 98.7 %

**V. Чувствительность**

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 2.0 мМЕд/мл.

**VI. Перекрестная реактивность**

Следующие антигены маркеров рака в высоких концентрациях были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Concentration	Equivalent FSH
hCG	100,000 mIU/ml	0.0 mIU/ml
TSH	100 µIU/ml	0.0 mIU/ml
LH	500 mIU/ml	0.0 mIU/ml
Prolactin	200 ng/ml	0.0 mIU/ml
HGH	200 ng/ml	0.0 mIU/ml

**VII. Хук-эффект**

Хук-эффект не наблюдался при концентрациях 3.000 мМЕд/мл FSH.



**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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)