

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА (ФСГ)

425-300, Follicle Stimulating Hormone (FH) Test System

Каталог. № : 425-300
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 Фолликулостимулирующего Гормона (ФСГ) в человеческой сыворотке.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) – гликопротеин, состоящий из двух субъединиц с приблизительной молекулярной массой 35,5 кД. α-субъединица сходна с такими же субъединицами других гипофизарных гормонов: ЛГ, ТТГ и ХГ, при этом β-субъединица уникальна. β-субъединица обеспечивает специфическую активность молекулы. Стимуляция гонадотропин-рилизинг гормоном (ГРГ) вызывает высвобождение ФСГ, а также ЛГ из гипофиза. ФСГ далее транспортируется с током крови в органы-мишени яичники или тестикулы.

У мужчин ФСГ воздействует на клетки Сертоли в семенниках, стимулируя синтез ингибина, который в дальнейшем специфически ингибирует секрецию ФСГ и андрогенсвязывающего белка. Таким образом, ФСГ непрямо поддерживает сперматогенез.

У женщин ФСГ действует на гранулезные клетки в яичниках, стимулируя стероидогенез. Все менструальные циклы имеют характерный ритм секреции ФСГ и ЛГ. Менструальный цикл разделен на фолликулиновую и лютеиновую фазы волнообразными изменениями концентрации гонадотропинов в середине цикла (ЛГ и ФСГ). По мере прогрессирования фолликулиновой фазы концентрация ФСГ снижается. Вблизи овуляции, в середине цикла, уровень ФСГ пикообразно поднимается до наивысшего значения (но меньше, чем ЛГ). Анализ уровня ФСГ полезен для выяснения гомеостаза фертильной регуляции в оси гипоталамус-гипофиз-гонады (1,2).

В этом методе калибраторы ФСГ, образцы пациента или контроли сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляются биотинилированные моноклональные антитела и фермент-меченые антитела (направленные против специфических и разных эпитопов ФСГ), и реагенты перемешиваются. Реакция между различными антителами к ФСГ и нативным ФСГ 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.

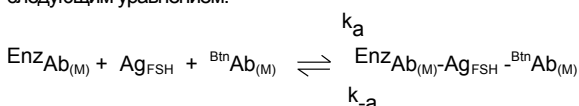
Использование стандартов ФСГ с известными различными концентрациями позволяет построить калибровочную кривую. Концентрации ФСГ в неизвестных образцах находят по этой калибровочной кривой.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммуоферментный анализ (тип 3)

Настоящие реагенты, необходимые для иммуоферментного определения, включают в избытке высокоаффинные и специфические 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-ФСГ антитела.

При смешивании биотинилированных анти-ФСГ 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:



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

Ag_{FSH} = нативный антиген (переменное количество)

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

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{\text{FSH}}\text{-B}^{\text{in}}\text{Ab}_{(M)}$ = 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:

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{\text{FSH}}\text{-B}^{\text{in}}\text{Ab}_{(M)} + \text{стрептавидин}_{\text{C.W.}} \Rightarrow \text{имм. Комплекс стрептавидин}_{\text{C.W.}} = \text{стрептавидин, иммобилизованный на ячейках}$
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 ФСГ- 1 мл/флакон - значки A-F

6 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями ФСГ 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) и 100 (F) мМЕд/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.

Замечание: Калибраторы на основе человеческой сыворотки прокалиброваны по 2-му Международному стандарту ВОЗ IRP 78/549.

B. Ферментный Реагент ФСГ– 13 мл/флакон - значок B

Один флакон, содержащий фермент-меченые 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 C

Один 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином и запечатанный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.

D. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок D

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

E. Субстрат A – 7.0 мл/флакон - значок S^A

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

F. Субстрат B – 7.0 мл/флакон - значок S^B

Один флакон, содержащий H₂O₂ в буфере. Хранить при 2-8°C.

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

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 служат кровь, сыворотка. 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 0.100 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 – стабилен до 1 года.

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).

- 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.**
- Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
- Добавьте по 0.100 мл (100 мкл) Ферментного Реагента ФСГ в каждую лунку.
- Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
- Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
- 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).
- 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

- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
- 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.**
- 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 ФСГ в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

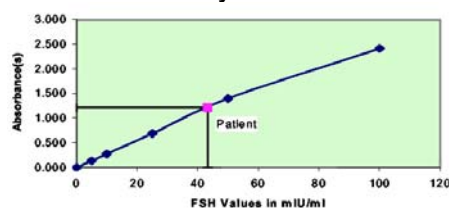
- Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
- Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации ФСГ в мМЕд/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
- Проведите оптимальную калибровочную кривую.
- Определите концентрации ФСГ в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция (1.214) пересекает стандартную кривую при 43.2 мМЕд/мл (см. рис. 1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация мМЕд/мл
Калибратор А	A1	0.001	0.001	0
	B1	0.001		
Калибратор В	C1	0.146	0.139	5
	D1	0.133		
Калибратор С	E1	0.276	0.277	10
	F1	0.278		
Калибратор D	G1	0.680	0.689	25
	H1	0.698		
Калибратор E	A2	1.444	1.399	50
	B2	1.354		
Калибратор F	C2	2.471	2.412	100
	D2	2.354		
Контроль 1	E2	0.162	0.157	5.6
	F2	0.152		
Контроль 2	G2	0.545	0.546	19.9
	H2	0.547		
Образец	A3	1.173	1.214	43.2
	B3	1.255		

* 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:

- Оптическая плотность Калибратора F должна быть ≥ 1.3
- 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

- Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
- Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
- Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
- 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/CE, 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

Было проведено исследование взрослой популяции для получения результатов на этом наборе *AccuBind™ FSH ELISA*. Результаты исследования показаны в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Ожидаемые значения для ФСГ мМЕд/мл 2-го стандарта IRP76/549 (метод *AccuBind™ FSH ELISA*)

Женщины	Фолликулярная фаза	3.0 - 12.0
	Середина цикла	8.0 - 22.0
	Лютеиновая фаза	2.0 - 12.0
	Постменопауза	35.0 - 151.0
Мужчины		1.0 - 14.0

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 данного набора *AccuBind™ FSH ELISA* для определения концентрации ФСГ внутри серии и между сериями определялась при анализе пула контрольных сывороток трех разных уровней. Число измерений, среднее значение, стандартное отклонение (σ) 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	5.0	0.25	5.4
Уровень 2	20	25.0	0.94	3.8
Уровень 3	20	40.6	1.64	4.0

ТАБЛИЦА 3

Воспроизводимость между сериями (мМЕд/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	20	4.7	0.42	9.0
Уровень 2	20	23.1	1.99	8.6
Уровень 3	20	37.8	3.2	8.4

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода *AccuBind™ FSH ELISA* составила 0.006 мМЕд/лунку, что эквивалентно образцу, содержащему ФСГ в концентрации 0.134 мМЕд/мл. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (мМЕд/мл) плюс 2σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод *AccuBind™ FSH ELISA* сравнивался с референсным радиоиммунным методом. Использовались образцы сывороток с низкой, средней и высокой концентрацией. Общее количество образцов составило 106. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	17.4	$Y = 0.98(x) - 1.7$	0.978
Метод сравнения	19.5		

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

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
ФСГ	1.0000	-
ЛГ	< 0.0001	1000 нг/мл
ХГЧ	< 0.0001	1000 нг/мл
ТТГ	< 0.0001	1000 нг/мл



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com