



НАБОР для количественного определения фолликулостимулирующего гормона в сыворотке

Кат. № : 102-1288
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (США)

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

Методика от 08-2007

1. ВВЕДЕНИЕ

Фолликулостимулирующий (FSH) и лютеинизирующий гормоны (LH) берут участие в регуляции роста и репродукции гонадными тканями, которые синтезируют и секретируют мужские и женские гормоны через механизм обратной связи.

FSH это гликопротеин, который секретируется базофильными клетками гипофиза. Гонадотропный рилизинг-гормон (ГРГ), который вырабатывается в гипоталамусе, контролирует освобождение FSH в гипофизе. Как и другие гликопротеины LH, TSH и HCG, FSH 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 FSH стимулирует рост и созревание фолликулов, действуя прямо на рецепторы зернистых клеток; увеличивается под его действием фолликулярный стероидогенез и стимулируется выработка LH. Выработанный LH потом связывается клетками теки и стимулирует стероидогенез. При созревании фолликула происходит увеличение внутриовариальной продукции эстрадиола, таким образом стимулируя активность рецепторов FSH и его связывание. Так что FSH, LH и эстрадиол задействованы в укреплении яичников и созревании у женщин.

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

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG FSH EIA есть твердофазовый энзимно-связанный иммуносорбентный набор (ELISA), основанный на принципе «сэндвича». Микротитрационные лунки, покрытые моноклональным антителом к единственному в своем роде антигенным детерминантам на β -субъединицах FSH-моллекул. Сыворотка пациентов, с эндогенным FSH инкубируется в лунках, покрытых энзимным конъюгатом (анти-FSH-сыворотка, конъюгирована с пероксидазой). После инкубации несвязанный конъюгат вымывается водой. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации FSH в образцах. После добавления раствора субстрата, насыщенность определяемого цвета пропорциональна концентрации FSH в сыворотке.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Для диагностики in vitro.

- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять места лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Лист данных безопасности доступен по требованию.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (делимые), покрытые анти-FSH моноклональными антителами (96 лунок).
2. **Стандарт (стандарт 0-5)**, 6 фл. (лиофилизированные), 1 мл.
Концентрация: 0,5; 10; 20; 50; 100 мМЕ/мл.
Конверсия: 6 мМЕ/мл = 1 нг/мл.
Содержит 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0.010% MIT в качестве консерванта.
3. **Ферментный конъюгат**, 1 фл., 11 мл, готовый к использованию. Анти-FSH-антитело, конъюгированный с пероксидазой хрена.
4. **Раствор субстрата**, 1 фл., 11 мл, готов к использованию TMB.
5. **Стоп раствор**, 0,5 M H₂SO₄, 6 мл, готов к использованию. Избегайте контакта со стоп-раствором. Может привести к раздражению кожи и ожогам.
*BND = 5-бромо-5-нитро-1,3-диоксан
MIT = 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

Примечание: Дополнительный 0 стандарт для разбавления образцов предоставляется по запросу.

4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при (450 нм ± 10 нм).
- Калиброванные точные микропипетки.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Хранение и стабильность набора

При хранении при 2-8°C неповрежденные реагенты будут сохранять свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микропланшет необходимо хранить при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть.

Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 2 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

4.3 Приготовление реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и требуемое количество лунок, что будут использоваться к комнатной температуре.

Стандарты: Разбавьте лиофилизованное содержимое флакона стандарта с 1,0 мл дистиллированной воды.

Примечание: Разбавленные стандарты стабильны 2 месяца при 2-8°C. Для более длительного хранения – заморозьте до -20°C.

4.4 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности.

4.5 Повреждение набора

При повреждении набора или компонентов, необходимо уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

5. ОБРАЗЦЫ

Для анализа должна использоваться только сыворотка.

Не используйте для анализа гемолизированные, иктерические и липемические пробы.

Помните: не должны использоваться образцы, что содержат азид натрия.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного осадка. Для пациентов, что получили антикоагулянтную терапию, может быть необходимо большее время для осадка.

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 5 дней при 2-8°C. Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и хранить до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить *0 стандартом* и повторно анализировать.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учесть.

Например:

а) Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте);

б) Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл 0 стандарта (тщательно перемешайте)

6. ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

6.1 Общие замечания

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Рекомендуется приготовить все реагенты, снять колпачки, все нужные лунки закрепить в держателе и т.д. Это обеспечит равномерное распределение времени без перерыва для каждого этапа пипетирования.
- Как правило ферментативная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.
- Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей необходимо закончить в течении 6 минут (помните это при ручном пипетировании).

6.2 Проведение анализа

В каждой процедуре должна использоваться калибровочная кривая.

1. Закрепите требуемое количество микротитровальных лунок в держателе.
2. Пипеткой внесите **25 мкл** каждого стандарта, контроля и образца, используя новые наконечники, в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку планшета. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **30 минут** при комнатной температуре.
5. Вытряхните содержимое лунок.
Промойте лунки дистиллированной водой **5 раз** (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшетку над промокательной бумагой и промокните остатки влаги.

Важное замечание:

Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!

6. Добавьте **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубируйте **10 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **50 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте калибровочную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: Результаты в данной инструкции были вычислены автоматически при использовании 4-параметровой логистической кривой. Данному методу отдается предпочтение. Другие функции обработки данных могут дать немного другие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться непосредственно с данной калибровочной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить. При вычислении концентрации этот коэффициент разбавления необходимо учитывать.

6.3.1. Типичный пример стандартной кривой

Последующие данные используются только в демонстрационных целях и **не должны** использоваться вместо обработки данных во время анализа.

Стандарт	млЕд/мл	Оптич. единицы
Стандарт 0	0	0,07
Стандарт 1	5	0,16
Стандарт 2	10	0,26
Стандарт 3	20	0,44
Стандарт 4	50	0,92
Стандарт 5	100	1,71

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, что каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

При изучении очевидно здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие данные:

Население	5% процентиль мМЕ/мл	95% процентиль мМЕ/мл
Мужчины	2,0	10
Женщины		
Фолликулярная фаза	2,0	10,0
Средина цикла	7,0	20,0
Лютеальная фаза	2,0	10,0
Пост менопауза	20,0	100,0

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам. Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0-100 мМЕ/мл

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность.

Протестированные гормоны	Концентрация	Интенсивность цвета, эквивалентная FSH в сыворотке (мМЕ/мл)
ХГЧ (ВОЗ 1 st IRP75/5370)	10000 мМЕ/мл	0
	50000 мМЕ/мл	0
	100000 мМЕ/мл	0
ТСГ (ВОЗ 2 nd IRP 80/558)	50 мкМЕ/мл	0
	100 мкМЕ/мл	0
ЛГ (ВОЗ 1 st IRP 68/40)	100 мМЕ/мл	0
	250 мМЕ/мл	0
	500 мМЕ/мл	0
Пролактин (ВОЗ 1 st IRP 75/504)	100 нг/мл	0
	200 нг/мл	0
ХГЧ (ВОЗ 1 st IRP 66/217)	100 нг/мл	0
	200 нг/мл	0

9.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена для среднего минус два стандартных отклонений 20 репликантов анализа 0 стандарта и равно 0,856 мМЕ/мл.

9.4 Точность

9.4.1 Точность в пределах анализа

Образцы сыворотки	1	2	3
Количество	10	10	10
Среднее FSH (мМЕ/мл)	7,37	14,24	38,13
Стандартное отклонение	0,58	0,64	1,60
Коэффициент вариации (%)	7,91	4,50	4,18

9.4.2 Точность между анализами

Образцы сыворотки	1	2	3
Количество	11	11	11
Среднее FSH (мМЕ/мл)	7,33	13,85	37,42
Стандартное отклонение	0,53	0,81	1,93
Коэффициент вариации (%)	7,18	5,84	5,15

9.5 Воспроизводимость

Образцы были обогащены добавлением тестостерона раствора при известной концентрации 1:1.

Ожидаемые значения были вычислены добавлением половины значения, определенных для неразбавленных образцов и половины значений для известных растворов. % восстановления был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Эндогенный ФСГ (мМЕ/мл)	Добавленная конц. (мМЕ/мл)	Измеренная конц. мМЕ/мл	Ожидаемая * конц. ФСГ (мМЕ/мл)	Извлечение %
1	54,64	0	54,6		
		50	74,8	77,3	96,8
		25	56,8	52,3	108,6
		10	40,8	37,3	109,4
		5	36,2	32,3	112,1
2	24,11	0	24,1		
		50	61,7	62,1	99,4
		25	38,2	37,1	103,1
		10	24,5	22,1	110,9
		5	18,8	17,1	110,4
3	7,01	0	7,0		
		50	52,9	53,5	98,9
		25	27,0	28,5	94,6
		10	11,9	13,5	88,5
		5	7,9	8,5	93,0

(*Эндогенный ФСГ/2 + добавленный ФСГ через 1:1 разбавление сыворотки обогащающим материалом.)

9.6 Линейность

Образец	Разведение	Измеренная конц. (мМЕ/мл)	Ожидаемая конц. (мМЕ/мл)	Извлечение, %
1	Неразв.	54,6	54,6	
		26,1	27,3	95,5
		12,6	13,7	92,0
		6,1	6,8	88,8
		3,3	3,4	95,6
2	Неразв.	24,1	24,1	
		13,4	12,1	111,0
		6,4	6,0	106,0
		3,2	3,0	107,6
		1,7	1,5	111,0
3	Неразв.	71,4	71,4	
		38,9	35,7	109,0
		19,4	17,8	108,5
		9,5	8,9	106,7
		4,7	4,5	106,1

10. ОГРАНИЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

10.1 Влияющие вещества

Неправильное обращение с образцами или модификация теста может влиять на результаты.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

Не наблюдалось эффекта до 1600 мМЕ/мл ФСГ.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +
38 (0342) 77 51 22
тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.com