



## НАБОР ИФА для определения в сыворотке человека фолликулостимулирующего гормона (FSH)

Кат. № : E-FSH-1P  
Количество : 96  
Производитель : Dima Diagnostika (Германия)

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

Методика от 11-2005

### ВСТУПЛЕНИЕ

Фолликулостимулирующий (FSH) и лютеинизирующий гормоны (LH) берут участие в регуляции роста и репродукции гонадальными 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 стимулирует активность рецепторов FSH и его связывание. Так что FSH, LH и эстрадиол задействованы в укреплении яичников и дозревании 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 угнетает 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.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор FSH есть твердофазным ферменто-связанным иммуносорбентным набором (ELISA), основанный на принципе «сэндвича». Микротитрационные лунки, покрытые моноклональным антителом к единственному в своем роде антигенным детерминантам на  $\beta$ -субъединицах FSH-молекулы. 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.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

1. Для диагностики in vitro.

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

### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микрострипы** покрытые анти-FSH моноклональными антителами (96 лунок).
2. **Калибраторы:** 5 флаконов, каждая 0,4 мл, готовы к использованию. 0,5; 15; 45; и 135 мМЕ/мл.
3. **Энзимный конъюгат:** 12 мл, FSH HRP конъюгат, готовы к использованию.
4. **Раствор субстрата:** 1 флакон H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TMB 0,25 г/л, 12 мл, готов к использованию.
5. **Стоп раствор:** 1 флакон серной кислоты 0,25 моль/л, 12 мл, готов к использованию.

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Неионизированная или дистиллированная вода.
2. Объемные пробирки и подставки.
3. Подставки для промывки
4. Микропипетки от 5 до 1000 мкл.
5. Многоканальная пипетка.
6. Шаговый координатный стол.
7. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при (450 нм  $\pm$  10 нм). Если доступен фотометр с двойной длиной волны, контрольный фильтр нужно установить на 600-690 нм.
8. Автоматический микропланшетный вошер, способный к распределению 300 мкл.

### ХРАНЕНИЕ

Все реагенты должны храниться при 2-8°C. Не замораживать.

### ЗАБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Для анализа должны использоваться только образцы сыворотки или плазмы.
2. Не используйте для анализа гемолизированные, иктерические и липемические пробы.
3. Хранить образцы при 2-8°C до максимум 2-х дней. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить. Избегайте повторного замораживания и размораживания. Для образца с концентрацией более 135 мМЕ/мл разбавить образец 1/1 дистиллированной водой.

### ПРОЦЕДУРА

#### Основные замечания

1. Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
2. 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. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
- В основном энзимная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.
- Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей необходимо закончить в течении 6 минут (помните это при ручном пипетировании).

#### ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Используйте протокол размещения образцов в лунках (см. Рисунок ниже), где используются **5 калибраторов** (стандартов) (SA-SE) и **1 бланк**. Пользователь может провести на выбор анализ в паре:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Кал.	Конц. ММЕ/мл
a	B	SD	P3										SA	0
b	SA	SE	P4										SB	5
c	SA	SE	P4										SC	15
d	SB	P1	P.										SD	45
e	SB	P1	P.										SE	135
f	SC	P2												
g	SC	P2												
h	SD	P3												

- Возьмите требуемые лунки из сумки и верните неиспользованные полоски в запечатанную сумку в холодильнике. Безопасно разместите микролунки в дополнительном держателе.
- Пипеткой внесите по **25 мкл калибратора и образца** в лунки и инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
- Добавьте **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку планшета кроме бланка и инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
- Промойте дистиллированной водой промывочным раствором 5 раз (**300 мкл** на лунку).
- Внесите 100 мкл **раствора субстрата** в каждую микролунку в том же порядке и времени как для ферментного конъюгата и бланка.
- Инкубируйте **10 минут** при комнатной температуре в темноте.
- Добавьте **100 мкл стоп раствора** в каждую микролунку, в том же порядке и времени как для раствора субстрата.
- Используя микропланшетный фотометр считайте абсорбцию каждой микролунки **при 450 нм** относительно бланка. Образовавшийся цвет устойчив как минимум в течение **30 минут**. Считайте оптическую плотность в течение этого времени.

#### ОЦЕНКА АНАЛИЗА

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

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Анализ не должен проводиться с высокогемолизированными, биологически загрязненными или липемическими образцами. Этот метод нужно использовать для анализа образцов только человеческой сыворотки.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чувствительность

Минимально определенная концентрация ФСГ в данном анализе составляет 1,0 мЕд./мл.

##### Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность:

ФСГ	100,0%
ЛГ	< 0.2%
ЧХГ	< 0.1%

##### Точность

###### Внутри тестовая точность

Образцы сыворотки	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Среднее ФСГ (мЕд./мл)	6,9	19,7	51,3
Стандартное отклонение	0,42	1,27	3,55
Коэффициент вариации (%)	6,1	6,4	6,9

###### Между тестовая точность

Образцы сыворотки	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Среднее ФСГ (мЕд./мл)	7,3	21,2	50,3
Стандартное отклонение	0,62	1,75	4,56
Коэффициент вариации (%)	8,5	8,3	9,1

##### Восстановление

Среднее восстановление составило 103,1% по соотношению к первичным концентрациям.

Ожидаемая концентрация	Обследуемая концентрация	Восстановление
6,6	7,1	107,5
12,2	11,7	95,9
41,8	44,5	106,4
38,3	37,4	97,7
78,1	84,3	107,9

##### Линейность

Были последовательно разбавлены два нулевых стандарта в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 101,2 %.

Пациент	Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
<b>1</b>		66.8	
Разбавл. 1 / 2	33.4	34.6	103.6
Разбавл. 1 / 4	16.7	18.1	108.3
Разбавл. 1 / 8	8.3	7.7	92.8
<b>2</b>		120.4	
Разбавл. 1 / 2	60.2	58.3	98.0
Разбавл. 1 / 4	30.1	29.0	96.3
Разбавл. 1 / 8	15.0	15.9	108.0

Ограничения процедуры анализа, не наблюдалось «хук-эффекта» «крюка» до 4000 ММЕ/мл FSH.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)