



Набір ІФА для визначення в сироватці людини ФОЛІКУЛО-СТИМУЛЮЮЧОГО ГОРМОНУ (ФСГ)

Каталог. № : KP6IW
Кількість : 96
Виробник : Radim (Італія)

Методика від 10-2003
Версія 6

Увага: основою при проведенні дослідження є оригінал інструкції.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Даний набір базується на імуноферментометричному аналізі (EIMA). В ньому використовуються два різні моноклональні антитіла до ФСГ, одними покриті лунки, а інші кон'юговані до пероксидази хрому (HRPO). Впродовж інкубації ФСГ в калібраторах і зразках водночас зв'язується з двома моноклонами, утворюючи комплекс «сендвіч». Після цієї інкубації весь незв'язаний матеріал видаляється циклом аспірації/промивання. Залишкова ферментативна активність в лунках прямо пропорційна концентрації ФСГ в калібраторах і зразках, та відобразатиметься при інкубації твердої фази з розчином хромогену (ТМБ) в субстратному буфері. Колориметричне зчитування здійснюється за допомогою спектрофотометра при 450 нм.

РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ: ПРИГОТУВАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- реагентів достатньо для 96 лунок
- зберігати набір при 2-8⁰С
- термін придатності кожного реагента вказаний на етикетці флакону.

1. **Покритий мікропланшет:** 96 лунок, покритих моноклональними антитілами до ФСГ. Невикористані лунки необхідно зберігати при 2-8⁰С в наявному поліетиленовому пакеті та герметично закритими.
2. **Калібратори:** 6 фл. ФСГ в основі сироватки, ліофілізовані. Концентрації: 0, 2, 10, 40, 100 та 200 мМО/мл. Консервант: неоміцин і тімеросал (<0,05%). Розвести калібратори 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8⁰С впродовж 1 тижня, для довшого зберігання слід заморозити до -20⁰С.
ПРИМІТКА: див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
3. **Ферментний кон'югат (концентрований),** 1 фл. (1,3 мл) моноклональних антитіл до ФСГ, кон'югованого пероксидазою хрому (HRPO) в Tris HCl, BSA та стабілізаторах. Консервант: неоміцин. Перед використанням додати 1,2 мл ферментного кон'югату до флакону з розчинником кон'югату (12 мл) або розбавити кон'югат 1:11 розчинником кон'югату (виходячи з необхідного об'єму для проведення аналізу) і ретельно перемішати. Зберігати розведений кон'югат при 2-8⁰С впродовж 2 місяців; для довшого зберігання слід заморозити до -20⁰С.
4. **Розчинник кон'югату:** 1 фл. (12 мл) Tris-HCl з BSA та стабілізаторами. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Готовий до використання.
5. **Контрольна сироватка:** 1 фл. ФСГ в основі сироватки. Ліофілізована. Консерванти: неоміцин та тімеросал (<0,05%). Розвести 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8⁰С 1 тиждень; для довшого зберігання заморозити до -20⁰С.
ПРИМІТКА: див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.
6. **Промивний розчин (концентрований):** 1 фл. (50 мл) PBS і Tween 20. Консервант: тімеросал (<0,05%). Розвести вміст флакону дистильованою водою до 1000 мл. У випадку нерозчинених кристалів, обробіть розчин, помістивши флакон на декілька хвилин в інкубатор при 37⁰С. Зберігати розведений промивний розчин при 2-8⁰С впродовж 1 місяця.
7. **Хромоген:** 1 фл. (15 мл) ТМБ із цитрат-фосфатним буфером і DMSO. Рідкий. Готовий до використання.
8. **Субстратний буфер:** 1 фл. (15 мл) цитрат-фосфатного буферу і H₂O₂. Рідкий. Готовий до використання.
9. **Блокуючий реагент:** 1 фл. (14 мл) N H₂SO₄. Готовий до використання.

ПРИМІТКА: в скляному посуді провести розведення 1+1 рівних порцій хромогену та субстратного буферу. Уникати прямого попадання світла впродовж 1 год. з часу приготування.

- Адгезивна плівка для планшету
- Поліетиленовий пакет

МАТЕРІАЛИ, ЩО ВИМАГАЮТЬСЯ АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Регульовані, автоматичні мікро піпетки зі змінними насадками.
- Мірна колба.
- Мікропланшетний струшувач на 1200 об/хв..
- Помпа для аспірації або автоматизований пристрій для промивки лунок.
- Мікропланшетний спектрофотометр з абсорбцією в межах 0-3,0 А інтервалу при 450 нм.
- Міліметровий графічний папір.
- Дистильована вода.

АВТОМАТИЗОВАНИЙ АНАЛІЗ

- даний аналіз може бути проведений з використанням автоматизованого апарату для ELISA наборів на мікро планшетах.
- Виробник гарантує використання даного набору в автоматизованих апаратах компанії RADIM і/або SEAC.
- При використанні інших автоматизованих мікропланшетних апаратів, відповідальність за правильність аналізів ELISA наборів у них несе користувач.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ та ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Не змішуйте реагенти різних партій.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- використовуйте ретельно очищений лабораторний посуд, вільний від забруднення іонами металів або окислюючі речовин.
- Використовуйте дистильовану воду, що зберігається в ретельно очищених ємкостях.
- уникайте забруднення зразків. З цієї метою для кожної Зразки та реагента використовуйте змінні насадки.
- Виконуйте чітко вимоги щодо інкубації як описано в розділі «Процедура аналізу».

Для того щоб уникнути особистого зараження та забруднення середовища, дотримуйтеся наступних застережень:

- Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте, не пийте, не курить і не користуйтеся косметикою в процесі аналізу.
- Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів. У їх випадку ретельно промийте 3% розчином гіпохлориду натрію. Будь-який очищуючий матеріал такого складу слід вважати потенційно інфекційним та дотримуватись вимог по його утилізації.

ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Аналіз може проводитись на зразках сироватки. Високо ліпемічні або гемолізовані Зразки необхідно видалити. Зберігати при 2-8^oC 1-2 дні. Для довшого зберігання Зразки повинні бути заморожені до -20^oC. Уникати повторного розморожування/заморожування.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ*

- Доведіть всі реагенти та зразки до кімнатної температури.
 - Перед використанням перемішайте перевертаючи зразки.
1. Приготувати лунки для: бланку, калібраторів, контрольної сироватки і зразків.
 2. Додати у відповідні лунки по **50 мкл** кожного калібратора, контрольної сироватки і зразка.
 3. Додати в кожну лунку по **100 мкл** ферментного кон'югату, крім лунки бланку.
 4. Накрити мікропланшет адгезивною плівкою (постачається в наборі) та легко змішати.
 5. Інкубувати лунки впродовж **60 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.).
 6. Зняти адгезивну плівку і ретельно аспірувати зі всіх лунок інкубаційну суміш.
 7. Промити лунки **4 рази 350 мкл** розведеного промивного розчину. Спірувати всю рідину із лунок.
 8. Розкапати у всі лунки по **200 мкл** розчину хромогену-субстрату (див. розділ Реагенти);
 9. Інкубувати лунки впродовж **15 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.), уникати прямого попадання світла.
 10. Розкапати у всі лунки по **100 мкл** блокуючого реагенту.
 11. Зчитати абсорбцію лунок за допомогою біхроматичного спектрофотометра при **450** з референтною довжиною хвилі **620 нм** (налаштовуючи апарат на нуль лункою бланку). Зчитування необхідно завершити впродовж **1 год** після завершення аналізу.

*При використанні в процедурі автоматизованих апаратів компаній RADIM і/або SEAC, зсилайтесь на відповідні інструкції.

СХЕМА АНАЛІЗУ (Див. ст.. 23)

ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використовуючи автоматичні апарати SEAC і/або RADIM для мікропланшетів спектрофотометричне зчитування виконуватиметься автоматично при 3 різних довжинах хвилі: 450, 405 і 620 нм, таким чином розширюючи амплітуду кривої.

Вивести калібрувальну криву на міліметровому графічному папері, виводячи концентрацію калібратора (вісь абсцис) проти абсорбції, отриманої для кожного калібратора (вісь ординат). Відповідні концентрації ФСГ в мМО/мл отримуються шляхом інтерполяції абсорбції кожного зразка на калібрувальну криву.

ПРИКЛАД ОБЧИСЛЕННЯ

Нижчезказані значення слід розглядати в якості прикладу та не повинні використовуватися замість даних дослідження.

Опис	Абсорбція	ФСГ
Калібратор 0 мМО/мл	0,007	
Калібратор 2 мМО/мл	0,070	
Калібратор 10 мМО/мл	0,349	
Калібратор 40 мМО/мл	1,218	
Калібратор 100 мМО/мл	1,902	
Калібратор 200 мМО/мл	2,460	
Зразок	0,316	9,06 мМО/мл

ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Значення, вказані нижче, є орієнтовними. Рекомендується щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон норми.

Жінки:	
- фолікулярна фаза	2,0 - 11мМО/мл
- пік проміжного циклу	5 -22 мМО/мл
- лютеальна фаза	1,5 - 10.5 мМО/мл
- менопауза	30 - 160мМО/мл
Чоловіки	
	1 -10мМО/мл

Критерії достовірності

Перед початком проведення обчислення результатів переконайтеся, що концентрація контрольної сироватки знаходиться в межах вказаних в листку контролю якості.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Специфічність

Даний метод показав наступні типи перехресної реактивності:

Аналіт	Концентрація	ФСГ мМО/мл
ЛГ (1-й IRP 68/40)	40 мМО/мл	0,05
	200 мМО/мл	0,05
	1000 мМО/мл	0,10
ТСГ (2-й IRP 80/558)	10 мкМО/мл	0,1
	100 мкМО/мл	0,8
	1000 мкМО/мл	0,7
ЛХГ (1-й IRP 75/537)	100 мМО/мл	0,5
	1000 мМО/мл	0,5
	10000 мМО/мл	0,5
	100000 мМО/мл	0,4

Чутливість

Чутливість була визначена на основі калібрувальної кривої і виражена як мінімальна доза, вказуючи на значну різницю із нульовим калібратором (середн. значення + 2 СВ). Ця доза складає **0,25 мМО/мл**.

Точність

Точність була оцінена виходячи із варіативності в межах процедури на між процедурами в 3 сироватках при різних концентраціях ФСГ.

В межах процедури (повторюваність)

Сироватка	Середн.	+/- (мМО/мл)	СВ	КВ %	К-сть реплікатів
A	7,85		0,26	3,31	10
B	16,28		0,58	3,56	10
C	42,3		2,45	5,79	10

Між процедурами (відтворюваність)

Сироватка	Середн.	+/- (мМО/мл)	СВ	КВ %	К-сть аналізів
A	9,12		0,52	5,70	10
B	18,39		1,41	7,67	10
C	51,40		4,27	8,31	10

Достовірність

Достовірність методу була перевірена тестами на відновлення та паралелізм.

Тест на відновлення

Відомі послідовні значення ФСГ були додані до об'єднання сироваток норми та досліджені.

Додано (мМО/мл)	Очікувані (мМО/мл)	Отримані (мМО/мл)	Відновлення %
P	—	3,1	—
P + 10,7	13,8	13,0	94,2
P + 55,1	58,2	55,2	94,8
P + 99,6	102,3	95,0	92,8
P + 184	187,0	175,0	93,5

Дослідження на паралелізм

Сироватка з високим вмістом ФСГ була досліджена при різних розведеннях нульовим калібратором.

Розбавлення	Очікувані (мМО/мл)	Отримані (мМО/мл)
S нерозведений	—	110,0
1:2	55,0	56,0
1:4	27,5	27,5
1:8	13,8	15,0
1:16	6,9	7,2

«Хук-ефект» високої дози

Кожного разу, коли зразки з дуже високими концентраціями антигена аналізуються нерозведеними в поетапному "сендвіч"- методі, як в цьому наборі, «хук-ефект» може дати значення концентрацій очевидно нижчі, ніж фактичні значення. В цьому наборі на спостерігається «хук-ефект» в концентрації до 2000 мМО/мл.

ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Результати аналізу повинні ретельно інтерпретуватись і бути підтверджені клінічними оцінками і подальшими діагностичними дослідженнями.

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

ПМП «ДІАМЕБ»
 вул. Чорновола, 97, м.
 Івано-Франківськ, 76005
 тел.: (0342) 775122 факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua