

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМЮЛЛЕРОВОГО ГОРМОНУ В СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ ЛЮДИНИ

Z17301, АМН

Кат. № : Z17301
Виробник : DIALAB (Австрія)

Методика від 14-03-2018
Версія 01



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

- **Довжина хвилі**
Вимірювальний фільтр: 450 нм
Референсний фільтр: 630 нм
- **Інкубаційний Час**
160 хвилин (90/30/30/10)
- **Ферментний кон'югат**
Кон'югат біотину
Кон'югат стрептавідину
- **Субстрат**
ТМВ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин)
- **Зразок**
Сироватка або плазма
- **Діапазон калібрування**
0 – приблизно 15.0 нг/мл

ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Набір ІФА Антимюллеровий гормон містить матеріали для кількісного вимірювання АМН в сироватці чи плазмі людини. Цей аналіз призначений тільки для діагностики *in vitro*. Цей аналіз не призначений для прогнозування реакції яєчників на протоколи стимуляції фолікулів.

МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

Мікропланшет 12x8 лунок, покритих антитілами АМН, іммобілізованими на внутрішній стінці кожної лунки. Зберігати при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності в упаковці з осушувачем для захисту від вологи.

Калібратор А/Розчинник для зразків 1x11 мл, містить 0 нг/мл АМН в білковому буфері і Pro-Clean 400. Зберігати закритим при 2-8 °С до закінчення терміну придатності.

Калібратори В - F ліофілізовані, в концентрації приблизно 0,09-15,0 нг/мл АМН в білковому буфері та Pro-Clean 400. Див. етикетки для точних концентрацій. Розведіть калібратори з 1 мл деіонізованої води, добре перемішайте та використовуйте після розведення. Концентрація АМН в калібраторах простежується відповідно до робочих калібраторів виробника. Значення, отримані за іншими методиками, можуть відрізнитись. Такі розбіжності, якщо вони існують, можуть бути спричинені різною методикою.

Позитивний контроль ліофілізований, один флакон для кожного рівня, що містить низьку і високу концентрацію АМН в буфері на основі білка та Pro-Clean 400; точні концентрації зазначені на етикетці. Розведіть контроль з 1 мл деіонізованої води, добре перемішайте та використовуйте після розведення.

Негативний контроль ліофілізований, один флакон для кожного рівня, що містить низьку і високу концентрацію АМН в буфері на основі білка та Pro-Clean 400; точні концентрації зазначені на етикетці. Розведіть контроль з 1 мл деіонізованої води, добре перемішайте та використовуйте після розведення.

Буфер для аналізів 1x 12 мл, містить білковий (BSA) буфер з не-ртутним консервантом. Зберігати при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Готовий до використання.

Біотиновий кон'югат 1x 12 мл, містить біотинільоване антитіло анти-АМН в білковому буфері з не-ртутним консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Готовий до використання.

Ферментний кон'югат 1x 12 мл, містить стрептавідин-HRP (пероксидаза хрому) у буфері на основі протеїну та не-ртутний консервант. Зберігати нерозбавленим при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Готовий до використання.

Субстратний розчин 1x 12 мл, містить розчин Тетраметилбензидину (ТМБ) у буфері з пероксидом водню. Зберігати при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Готовий до використання.

Стоп-розчин 1x 12 мл, містить 0,2 М сірчаної кислоти. Зберігати при температурі 2-30 °С до закінчення терміну придатності.

Промивний розчин 1x 60 мл, містить буферний фізіологічний розчин з неіонним детергентом. Зберігати при температурі 2-30 °С до закінчення терміну придатності. Перед використанням розбавте 25-кратно деіонізованою водою.

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ РЕАГЕНТІВ

Мікропланшет	Зберігати при температурі 2-8 °С до закінчення терміну придатності в упаковці з осушувачем для захисту від вологи.
Калібратори В - F	Зберігати закритим при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Аліквотуйте і заморозьте у пластикових пробірках для багаторазового використання. Альтернативно, заморозьте у тій же пробірці протягом 2 годин після розведення. Уникайте повторного заморожування/відтавання.
Контроль високий Контроль низький	Зберігати закритим при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Аліквотуйте і заморозьте у пластикових пробірках для багаторазового використання. Альтернативно, заморозьте у тій же пробірці протягом 2 годин після розведення. Уникайте повторного заморожування/відтавання.
Буфер для аналізів Біотиновий кон'югат Ферментний кон'югат Субстратний розчин	Зберігати при 2-8 °С до закінчення терміну придатності.
Стоп-розчин Промивний розчин	Зберігати при температурі 2-30 °С до закінчення терміну придатності.

Необхідні матеріали, що не постачаються з набором

- Мікропланшетний зчитувач з можливістю проведення вимірювання при довжині хвилі 450 нм та 630 нм
- Мікропланшетний орбітальний шейкер
- Мікропланшетний вошер
- Піпетки на 10-250 мкл
- Піпетка-пенітер
- Вортексний міксер
- Деіонізована вода

КОРОТКИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ

(Див. оригінал інструкції).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Даний аналіз – це кількісний імуоферментний трьохкроковий аналіз типу сендвіч. На першому етапі калібратори, контролю та невідомі зразки додають в мікропланшетні лунки, що містять антитіла до АМН, та інкубують. Після першої інкубації та промивання лунки інкубують з біотинільованим розчином антитіла АМН. Після другої інкубації та промивання лунки інкубують з розчином кон'югату стрептавідин-пероксидаза хрому (SHRP). Після третьої стадії інкубації та промивання лунки інкубують з розчином субстрату (ТМБ), після чого додають кислотний стоп-розчин. В принципі, кон'югат антитіло-біотин зв'язується з твердофазним комплексом антитіло-антиген, який, у свою чергу, зв'язується з кон'югатом стрептавідин-фермент. Комплекс антитіло-антиген-біотиновий кон'югат-SHRP, нанесений в лунці, виявляється реакцією фермент-субстрат. Ступінь ферментативного перетворення субстрату визначається методом вимірювання подвійної довжини хвилі при 450 нм як основного фільтра та при 630 нм як референтного фільтра. Виміряне поглинання прямо пропорційно концентрації АМН у зразках та калібраторах.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- Тільки для використання в діагностиці *in vitro*.
- Дотримуватись правил належної лабораторної практики.
- Використовувати засоби індивідуального захисту. Під час роботи одягати лабораторний халат та одноразові рукавички.
- Обробляти та проводити утилізацію всіх реагентів та матеріалів відповідно до застосовуваних правил.
- Попередження: потенційний біологічно небезпечний матеріал

Цей реагент може містити деякі матеріали людського походження. Обробляти всі реагенти та зразки пацієнта як небезпечний матеріал.

- Попередження: потенційна хімічна небезпека
Деякі реагенти цього набору містять Pro-Clean 400 і азид натрію в якості консерванту. Pro-Clean 400 та азид натрію у концентрованих кількостях подразнюють шкіру та слизові оболонки.

ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Сироватка та літій-гепаринова плазма є рекомендованим типом зразка.
- Вимоги щодо обробки та зберігання зразків залежать від типу пробірки для забору крові, що використовується. Будь ласка, зверніться до інструкцій виробника, щоб отримати вказівки. Кожна лабораторія повинна визначити прийнятність власних пробірок для забору крові та продуктів для відділення сироватки.
- Зразки можна зберігати при 4 °C, якщо вони будуть аналізовані протягом 24 годин; в іншому випадку зразки повинні зберігатись при -20 °C або -80 °C, щоб уникнути втрати біоактивності та забруднення.
- Унікати аналізу ліпідних, гемолізованих або жовтяничних зразків.
- Уникайте повторного заморожування та відтавання зразків. Зразки розморожувати не більше 3 разів.
- Для транспортування помістіть зразки в герметичні контейнери для біологічно небезпечних зразків з відповідною ідентифікацією зразків і інформацією про тестування у зовнішній кишені упаковки зразка. Дотримуйтесь вимог DOT та IATA під час транспортування зразків.

ПРОЦЕДУРНІ ПРИМІТКИ

1. Для успішного виконання даного аналізу необхідно повне розуміння цієї інструкції. Користувач несе відповідальність за перевірку відповідності аналізу. Точні результати будуть отримані лише за умови дотримання точних лабораторних методів та інструкцій.
2. Калібрувальна крива повинна бути побудована з кожним аналізом.
3. Перед використанням доставити всі реагенти набору до кімнатної температури (23 ± 2 °C). Реагенти ретельно перемішайте перед використанням обережним перевертанням. Не змішуйте компоненти з різних партій і не використовуйте будь-який компонент після закінчення терміну придатності.
4. Використовуйте чистий одноразовий наконечник для піпетки для кожного реагента, калібратора, контролю або зразка. Уникайте мікробного забруднення реагентів, забруднення субстратних розчинів кон'югатами HRP. Фермент, що використовується як мітка, інактивується киснем, і дуже чутливий до мікробного забруднення; азид натрію, хлороорганічна кислота та ароматичні хлороорганічні речовини часто зустрічаються в джерелах лабораторної води. Використовуйте деіонізовану воду.
5. Неповне промивання негативно впливає на результат і точність аналізу. Необхідно стежити за тим, щоб додати ТМБ в лунки для мінімізації потенційного порушення аналізу внаслідок варіювання часу інкубації ТМБ. Уникайте впливу на реагенти надмірного тепла або прямого сонячного світла.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Мікропланшет	Виберіть кількість лунок, необхідних для аналізу. Інші невикористані лунки слід помістити в упаковку з осушувачем. Упаковка повинна бути знову закрита для захисту від вологи.
Калібратори В-F	Закрийте та розведіть калібратори АМН В-F з 1 мл деіонізованої води. Розчиніть, добре перемішайте і використовуйте після розведення. Аліквотуйте і заморозьте в пластикових пробірках для багаторазового використання. Крім того, заморозьте в тій же пробірці протягом 2 годин після розведення. Уникайте повторного заморожування/відтавання.
Контроль високий Контроль низький	Закрийте та розведіть контроль АМН з 1 мл деіонізованої води. Розчиніть, добре перемішайте і використовуйте після розведення. Аліквотуйте і заморозьте в пластикових пробірках для багаторазового використання. Крім того, заморозьте в тій же пробірці протягом 2 годин після розведення. Уникайте повторного заморожування/відтавання.
Промивний розчин	Розбавте 25x концентрований розчин для промивання деіонізованою водою. Розведений промивний розчин стабільний протягом 1 місяця при кімнатній температурі (23 ± 2 °C), коли зберігається в щільно закритій пляшці.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Всі реагенти та зразки перед початком аналізу повинні бути витримані при кімнатній температурі (23±2 °C) і ретельно перемішані перед використанням обережним перевертанням. Стандарти, контроль і зразки пацієнтів повинні аналізуватися в дублях.

Увага: Всі зразки сироваток з концентрацією вище, ніж концентрація найвищого калібратора, повинні бути перемішані і розведені розчином 0 нг/мл (Калібратор А/Розчинник для зразків) перед тестуванням.

1. Розведіть калібратори В-F і контроль, високий та низький, кожен в 1 мл деіонізованої води. Дайте їм розчинитися протягом 10 хвилин. Ретельно перемішайте.
2. Позначте смужки, які будуть використані.
3. Внесіть по 25 мкл калібратора, контроль і невідомих зразків у відповідні лунки планшета.
4. Додайте по 100 мкл буфера для аналізів в кожен лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер.
5. Інкубуйте протягом 90 хвилин при кімнатній температурі (23±2 °C) на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв.
6. Використовуючи автоматичний вошер, промийте 5 разів промивальним буфером (350 мкл/лунку).
7. Додайте по 100 мкл розчину Біотинного кон'югату в кожен лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер.
8. Інкубуйте лунки на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (23±2 °C).
9. Використовуючи автоматичний вошер, промийте 5 разів промивальним буфером (350 мкл/лунку).
10. Додайте по 100 мкл ферментного кон'югата в кожен лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер.
11. Інкубуйте лунки на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (23±2 °C).
12. Використовуючи автоматичний вошер, промийте 5 разів промивним буфером (350 мкл/лунку).
13. Додайте 100 мкл субстратного розчину в кожен лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер. Уникайте потрапляння прямих сонячних променів.
14. Інкубуйте лунки при кімнатній температурі (23±2 °C) протягом 8-12 хвилин на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв.
Зауваження: Будь ласка, контролюйте візуально розвиток забарвлення для оптимізації часу інкубації.
15. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожен лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер. Виміряйте оптичну щільність в лунках при 450 нм. Вимірювання оптичної щільності мікропланшетів повинно бути виконано протягом 20 хвилин після додавання стоп-розчину.

ЗАУВАЖЕННЯ: Необхідно при зчитуванні абсорбції програмувати нульовий стандарт як «Бланк». Якщо інструмент має корекцію довжини хвилі, встановіть прилад на вимірювання подвійної довжини хвилі при 450 нм з корекцією фонові довжини хвилі при 630 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ

Результати в цій інструкції були розраховані шляхом нанесення логарифмічних даних оптичної щільності (OD) на осі Y та логарифмічної концентрації АМН на осі X, використовуючи кубічну регресійну криву. Альтернативно, можна використовувати log-log quadratic regression. Інші способи зменшення даних можуть давати дещо інші результати.

1. Оптиміальні результати можуть бути отримані при температурі інкубації (23 ± 2 °C).
2. Розрахуйте середнє значення поглинання для кожного калібратора, контролю та зразка.
3. Використовуючи логарифмічний папір, відзначте точки розрахованих значень середнього поглинання калібраторів на вертикальну вісь Y, а відповідні концентрації АМН в нг/мл на горизонтальну вісь X. Для розрахунку рекомендується використовувати криву кубічної регресії.
4. Визначте концентрацію АМН контроль і зразків з калібрувальною кривою, порівнюючи розраховані середні значення поглинання з відповідною концентрацією АМН.
5. Всі зразки зі значеннями, більшими, ніж у найвищого калібратора, попередньо розвести 0 нг/мл (Калібратором А/Розчинником для зразків) і проаналізувати повторно.
6. Будь-які зразки зі значеннями нижче аналітичної чутливості слід вважати такими ж.
7. Помножте результати на фактор розведення, якщо це необхідно.

Репрезентативна калібрувальна крива:

Номер лунки	Вміст лунки	Середнє поглинання	Концентрація (нг/мл)
A1, A2	Калібратор А	0.04 (бланк)	0
B1, B2	Калібратор В	0.04	0.08

C1, C2	Калібратор C	0.09	0.30
D1, D2	Калібратор D	0,31	1.03
E1, E2	Калібратор E	1.07	3.96
F1, F2	Калібратор F	2.86	14.2

Застереження: Наведені вище дані не повинні використовуватися замість даних, отриманих користувачем в лабораторії.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна встановлювати свої власні діапазони нормальних значень.

- Контролі АМН ELISA або інші комерційні контролю повинні укладатися у встановлені довірчі інтервали.
- Довірчі інтервали для контролів АМН надруковані на калібрувальній карті.
- Калібрувальна крива, контролю низького і високого рівнів повинні бути включені в кожен аналіз.
- Розчин ТМВ має бути безбарвним. Розвиток будь-якого забарвлення може свідчити про забруднення або нестабільність реагенту.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Ці зразки проаналізували, використовуючи тест Dialab AMN ELISA. Очікувані діапазони для АМН були розраховані на зразки сироватки з використанням 90-95% непараметричної оцінки з використанням Analyze-It® для Microsoft Excel.

Зразок	Кількість зразків	Середній вік	Середнє АМН (нг/мл)	Діапазон АМН (нг/мл)
Жінки < 8 тижнів	33	3	0.00	< 0.02-0.49
Жінки < 8 років	23	5	1.69	0.05-10.40
Жінки 11 – 20 років	35	17	3.25	0.62-11.0
Жінки 21 – 30 років	33	26	3.78	< 0.02-10.39
Жінки 31 – 40 років	56	35	2.39	0.14-10.40
Жінки 41 – 50 років	79	44	0.42	< 0.01-6.35
Жінки > 51 року	94	59	0.00	< 0.02-0.39
Чоловіки < 3 днів	15	немає даних	50.84	25.9-69.1
Чоловіки < 3 місяців	52	5 днів	83.39	24.22-275.46
Чоловіки 1 – 11 років	45	7 років	122.40	38.25-322.40
Чоловіки 12 – 20 років	23	14 років	6.47	1.12-143.64
Чоловіки > 20 років	83	47 років	4.90	0.59-17.71

Примітка: Кожній лабораторії рекомендується визначити контрольні діапазони для власної групи пацієнтів. Результати цього аналізу повинні використовуватися у поєднанні з іншою відповідною клінічною інформацією.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Всі аналітичні характеристики представлені в нг/мл (1 нг/мл = 7.14 пмоль/л)

Межа кількісного визначення (LoD):

Мінімальна кількість АМН, яка може бути визначена у зразку з 95% ймовірністю (n = 24) склала 0.023 нг/мл. Дане значення було визначено при дослідженні 5 зразків сироватки в діапазоні 0.03-0.346 нг/мл згідно з рекомендаціями CLSI. Протягом 2 днів було проведено 12 досліджень зразків в дублях.

Межа якісного визначення (LoQ):

Встановлена мінімальна кількість при 20% похибки склала 0.06 нг/мл. Дане значення було визначено при дослідженні 8 зразків в діапазоні 0.03-2.85 нг/мл згідно з рекомендаціями CLSI. Протягом 2 днів було проведено 12 досліджень зразків сироватки в дублях (n = 24).

Похибка:

Відтворюваність розрахована при аналізі трьох пулів сироватки. Дослідження включало 12 постановок в 4 репліках кожна (n = 48). Значення відтворюваності були розраховані згідно з рекомендаціями NCCLS і представлені в наступній таблиці:

Зразок	Середня конц. (нг/мл)	Всередині серії		Між серіями		Загальне	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Пул 1	0.35	0.001	1.97	0.02	4.63	0.02	5.13
Пул 2	0.72	0.03	3.66	0.03	4.79	0.04	6.03
Пул 3	1.85	0.07	4.00	0.04	1.98	0.08	4.46

Лінійність:

Згідно з рекомендаціями NCCLS, були проаналізовані 3 зразки сироватки, що містять різну кількість АМН, розведені Калібратором А/Розчинником для зразків. Були розраховані % розведення кожного зразка:

Зразок	Розведення	Очікуване значення (нг/мл)	Отримане значення (нг/мл)	% розведення
1	--	7.39	--	--
	1:2	3.69	3.85	104%
	1:4	1.85	1.87	101%
	1:8	0.92	0.94	102%
2	1:16	0.46	0.46	99%
	--	4.44	--	--
	1:2	2.22	2.26	102%
	1:4	1.11	1.20	108%
3	1:8	0.56	0.61	109%
	1:16	0.28	0.29	105%
	--	7.11	--	--
	1:2	3.55	3.89	109%
3	1:4	1.78	1.90	107%
	1:8	0.89	0.99	111%
	1:16	0.44	0.48	107%

Відновлення:

Визначену кількість АМН було додано в 3 зразки сироватки, що містять різну кількість АМН. Концентрація АМН була виміряна до і після додавання і визначено % відновлення:

Зразок	Доданий АМН (нг/мл)	Очікуване значення (нг/мл)	Отримане значення (нг/мл)	% відновлення
1	1.56	1.92	1.78	93%
		2.27	2.18	96%
		2.63	2.52	96%
2	1.13	1.51	1.42	94%
		1.89	1.69	89%
		2.27	1.96	86%
3	1.20	1.58	1.41	89%
		1.95	1.78	91%
		2.33	2.11	91%

Аналітична специфічність:

Ця пара моноклональних антитіл, що використовується в аналізі, специфічна для АМН людини, і не реагує перехресно на інші види (бичачий, коня, вівці, собаки, щура та миші).

Крос-реагент	Концентрація (нг/мл)	% крос-реактивності
Інгібіт А	100	--
Інгібіт В	100	--
Активін А	50	--
Активін В	50	--
Активін АВ	50	--
Повна довжина АМН димера	1000	100
rAMH	130	--
Mature AMH	120	1.33
hAMH (Pro)	300	0.23
ProMature hAMH	110	100

Інтерференція:

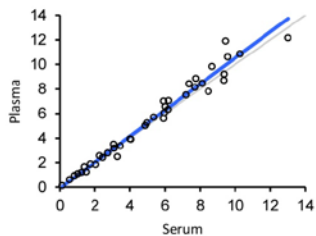
При додаванні в зразки сироватки потенційно інтерферуючих речовин (гемоглобін, тригліцериди і білірубін) в концентрації, яка в 2 рази перевищує фізіологічне значення, концентрація АМН/MIS склала \pm 10% від контрольної. Дослідження проведено згідно з рекомендаціями NCCLS.

Речовина	Аналітична концентрація (мг/мл)	Концентрація без додавання (нг/мл)	Концентрація з додаванням (нг/мл)	Різниця, %
Гемоглобін	1.35	6.15 4.67	6.21 4.62	1.01 -0.88
Тригліцериди	5.00	6.15 4.67	6.33 4.51	2.98 -3.37
Білірубін	0.6	4.86 3.11	4.80 3.08	-1.23 -0.77

Тип зразка:

40 зразків сироватки і літєвої гепаринової плазми в діапазоні 0.13-13.01 нг/мл були проаналізовані за допомогою даного методу. Результати аналізували за допомогою методу Passing Bablok.

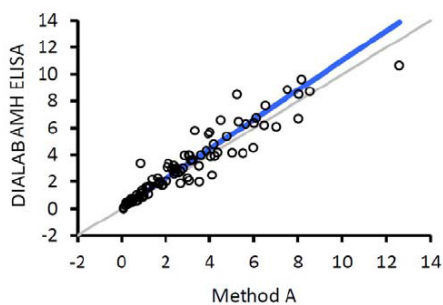
Плазма = 1.06 (сироватка) – 0.10, (r = 0.995; P < 0.0001)



Порівняння методів:

Даний набір порівняли з іншим комерційним набором (метод А), використавши 90 зразків сироватки в діапазоні 0.1-12.58 нг/мл. Результати аналізували за допомогою методу Paasing Bablok.

Даний набір (AL-105) = 1.10(метод А) + 0.06, (r=0.98; P<0.0001)



ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих правил.



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
 вул. Чорновола, 97
 м. Івано-Франківськ, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

