

НАБОР ИФА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ MIS/AMH
**(АНТИМЮЛЛЕРОВ ГОРМОН/
ФАКТОР РЕГРЕССИИ МЮЛЛЕРОВА
КАНАЛА)**

AL-105-i, UltraSensitive AMH/MIS ELISA

Каталог. № : **AL-105-i**
Производитель: **Ansh Labs, (США)**

Методика от **08-04-2014**
Версия **05**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор содержит материалы для количественного измерения MIS/AMH в человеческой сыворотке и других биологических жидкостях. Только для диагностики *in vitro*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Ингибирующее вещество Мюллера канала (MIS), также известное как антимюллеров гормон (AMH) - это гликопротеин, димер, состоящий из двух мономеров с м.м. около 72 кДа, связанных дисульфидными мостиками [1]. MIS/AMH принадлежит к семейству трансформирующих факторов роста-β (TGF-β), которое включает TGF-β и различные гликопротеины: ингибины и активины [2]. Все члены это семейства являются димерным гликопротеинами и все вовлечены в регуляцию роста и дифференцировки тканей. Был выделен и секвенирован ген человека, кодирующий MIS/AMH, он расположен на коротком плече 19 хромосомы [3]. Кроме того, был выделен и охарактеризован специфический рецептор для MIS/AMH [4,5]. У мышей отсутствие MIS/AMH приводит к усиленной потере фолликулов и преждевременному прекращению овуляторного цикла [6]. У мужчин MIS/AMH продуцируют клетки Сертоли, у женщин гормон секретируется гранулезными клетками яичников. В период эмбрионального развития у мужчин секреция MIS/AMH клетками Сертоли необходима для регрессии Мюллеровых протоков, что является частью нормального формирования мужских репродуктивных органов [7]. У женщин мюллеровы протоки являются предшественниками матки, фаллопиевых труб и верхней части влагалища. У мужчин секреция MIS/AMH клетками Сертоли начинается в период эмбриогенеза и продолжается на протяжении всей жизни. После пубертатного периода его экспрессия снижается, и низкий уровень экспрессии AMH может сохраняться у взрослого индивидуума [2]. У женщин уровень MIS/AMH в сыворотке относительно низкий по сравнению с мужчинами вплоть до наступления пубертата. После этого концентрация циркулирующего MIS/AMH медленно снижается до менопаузы, во время которой уровень MIS/AMH падает до неопределяемых величин (при измерении иммунными методами). Потенциальное клиническое применение метода определения MIS/AMH включает: оценку овариального резерва и перименопаузальные изменения периода у фертильных женщин; выявление и контроль гранулезоклеточных опухолей; диагностика преждевременного пубертата и, наоборот, его позднего наступления у подростков; дифференциальная диагностика интерсексуальных расстройств; диагностика крипторхизма и анорхизма, оценка функции мужских гонад в любом возрасте [2, 8].

ПРИНЦИП МЕТОДА

В данном наборе используется принцип ферментно-усиленного "трехступенчатого" сэндвич-иммуноанализа. При проведении анализа стандарты, контроли и образцы пациентов инкубируются в микропланшетных ячейках, покрытых антителами к MIS/AMH. После инкубации и промывки ячейки обрабатываются другими биотинилированными антителами к MIS/AMH. После второй инкубации и последующей промывки добавляется стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. После третьей инкубации и последующей промывки в ячейки инкубируются с субстратом ТМБ. Затем добавляется стоп-раствор, определяется количество превращённого ферментом субстрата путем измерения оптической плотности при двух длинах волн 450 и 630 нм. Измеренное поглощение прямо пропорционально концентрации присутствующего MIS/AMH. Набор стандартов MIS/AMH используется для построения стандартной кривой поглощения, по которой могут быть рассчитаны неизвестные концентрации MIS/AMH в исследуемых образцах.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

CAL-105A AMH/MIS Калибратор А/Разбавитель образцов:
Один флакон 11 мл, содержит 0 нг/мл AMH в белковом буфере и ProCin 400. Закрытый флакон хранится при 2-8 °С до указанного срока годности набора.

CAL-105B – CAL-105F AMH/MIS Калибраторы В-F (лиофилизированные):

Пять флаконов, содержат приблизительно 0,09 – 15,0 нг/мл AMH в белковом буфере и Pro-Mullerian Clean 400. Точные концентрации указаны в калибровочной карте. Закрытые флаконы хранятся при 2-8 °С до указанного срока годности набора. Разведите калибраторы В – F в 1 мл деионизированной воды. Тщательно перемешайте. Для многократного использования аликвотируйте и заморозьте. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

CTR-105-I – CTR-105-II AMH/MIS Контроли I и II (лиофилизированные):

Два флакона, содержат контроли высокого и низкого уровней в белковом буфере и ProClean 400. Точные концентрации указаны в калибровочной карте. Закрытые флаконы хранятся при 2-8 °С до указанного срока годности набора. Разведите Контроли I и II в 1 мл деионизированной воды. Тщательно перемешайте. Для многократного использования аликвотируйте и заморозьте. Альтернативно, заморозьте в той же пробирке в течение 2 часов после восстановления. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания.

PLT-105 Микрострипы с сорбированными анти-AMH антителами:

Один держатель стрипов, содержащий 96 микроячеек, покрытых анти-AMH IgG, иммобилизованными на внутренних стенках ячеек. Хранить при 2-8 °С до указанного срока годности в закрывающемся пакете, защищаемом от влаги.

ASB-205 AMH/MIS Рабочий буфер:

Один флакон 12 мл, содержит белковый буфер с БСА в консервантом, не содержащим ртути. Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

BCR-105 Конъюгат биотинилированных анти-AMH антител (готов для использования):

Один флакон, содержащий 12 мл анти-AMH антител, конъюгированных с биотином в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

SAR-105 Конъюгат стрептавидин/фермент (готов для использования):

Один флакон 12 мл, содержит конъюгат стрептавидин-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Хранить при 2-8 °С до указанного срока годности.

TMB-100 ТМБ хромогенный раствор:

Один флакон, содержащий 12 мл ТМБ в буфере с H₂O₂. Хранить при 2-8 °С до указанного срока хранения.

STP-100 Стоп раствор:

Один флакон, 12 мл, содержащий 0.2 М серной кислоты. Хранить при 2-30 °С до указанного срока хранения.

WSH-100 Концентрат промывочного буфера А:

Один флакон, содержит 60 мл раствора солевого буфера с неионным детергентом. Хранить при 2-30 °С до указанного срока годности. Перед использованием разбавлять 25-кратно деионизированной водой.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450, 405 и 630 нм.
2. Микропланшетный орбитальный шейкер.
3. Автоматический микропланшетный вошер.
4. Полуавтоматический/ручной микродозатор на 10-250 мкл.
5. Пипетка-репитер.
6. Вортекс.
7. Деионизированная вода.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для диагностики *in vitro*.

- a) При работе соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики.
- b) Используйте одноразовые перчатки и очки при работе с компонентами набора.
- c) Реагенты и компоненты набора необходимо утилизировать, руководствуясь установленными правилами.

ВНИМАНИЕ: Потенциально Биологически Опасный Материал

Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазмы. Используемые сыворотка или плазма тестируются 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 соблюдая биологическую безопасность 2го уровня, как рекомендуется при работе с потенциально инфекционно-опасным человеческим материалом, как это описано в руководстве «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях» Центра Контроля Заболеваемости/Национального Института Здоровья, 5е издание, 2007.

ВНИМАНИЕ: Потенциально Химически Опасный Материал

Некоторые компоненты набора содержат Проклин 400 и азид натрия в качестве консерванта, которые в концентрированном виде являются раздражающими кожу и слизистые оболочки веществами. Во входящих в состав набора реагентах они присутствуют в разведенном виде, что значительно снижает риск при контакте, но не полностью. Избегайте контакта с кожей, слизистыми, одеждой. При попадании промывайте большим количеством воды и обращайтесь к врачу за консультацией. Смывайте отходы большим количеством воды для предотвращения накопления опасных химических веществ в канализационной системе.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ

- Для анализа рекомендуется использовать сыворотку литий-гепариновую плазму.
- Рекомендации по сбору, приготовлению и хранению образцов крови зависят от типа используемых пробирок. Использовать согласно инструкциям производителя. Каждая лаборатория должна использовать свои собственные пробирки для сбора образцов и средства для отделения сыворотки.
- Если образцы будут использоваться в течение 24 часов, их можно хранить при 4 °С. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при -20 °С или -80 °С, чтобы избежать потери активности.
- Не используйте для анализа сильно гемолизированные или липемические образцы.
- Избегайте повторных циклов заморозки и разморозки образцов. Допустимо не более 3 циклов оттаивания.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПОРЯДКУ РАБОТЫ

- Для успешного использования набора необходимо полное понимание вложенной инструкции. Правильные результаты будут получены только при использовании точной лабораторной техники и аккуратном выполнении инструкции.
- Стандартная кривая должна быть включена в каждое определение.
- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре (~25°C). Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, осторожно переворачивая. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Используйте чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта, контроля и образца. Избегайте загрязнения микроорганизмами реагентов, загрязнения раствора ТМБ конъюгатом. Фермент, используемый как метка, инертен к кислороду и крайне чувствителен к микробиологическим загрязнениям, хлорноватистой кислоте, азиду натрия и ароматическим хлорогидрокарбонатам, зачастую находящимся в воде. Используйте деионизированную воду.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации с субстратом, добавляйте стоп раствор в ячейки в той же последовательности и с такой же скоростью, как и раствор ТМБ. Избегайте контакта реагентов с источниками тепла и прямым солнечным светом при хранении реагентов и во время инкубации.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- AMN/MIS Калибраторы В-Ф и контроли:** разведите калибраторы В-Ф и контроли в 1 мл деионизированной воды каждый. Тщательно перемешайте.
- Промывочный буфер:** раствор промывочного буфера готовится 25-кратным разбавлением деионизированной водой концентрата промывочного буфера. Промывочный буфер стабилен один месяц при хранении при комнатной температуре в плотно закрытом сосуде.

- Микролунки:** выберите необходимое для анализа количество привитых ячеек. Верните лишние ячейки в закрывающийся пакет с осушителем. Пакет должен быть защищенным от влаги.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре (~25° С) и тщательно перемешаны перед использованием осторожным переворачиванием. Стандарты, контроли и образцы пациентов должны анализироваться в дубляж.

ВНИМАНИЕ: Все образцы сывороток с концентрацией аналита выше, чем концентрация самого высокого стандарта должны быть тщательно перемешаны и разведены раствором 0 нг/мл (Стандарт А/Разбавитель образцов) перед тестированием.

- Разведите калибраторы В-Ф и контроли в 1 мл деионизированной воды. Дайте им раствориться в течение **10 минут**. Тщательно перемешайте.
- Пометьте стрипы, которые будут использованы.
- Внесите по **25 мкл** стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки планшета.
- Добавьте по **100 мкл** раствора AMN/MIS Рабочего буфера в каждую ячейку, используя полуавтоматический диспенсер.
- Инкубируйте в течение **90 минут** при комнатной температуре на орбитальном шейкере при **600-800 об/мин**.
- Используя автоматический вошер, промойте **5 раз** Промывочным буфером (**350 мкл/лунку**).
- Добавьте по **100 мкл** раствора Биотинового конъюгата в каждую ячейку, используя полуавтоматический диспенсер.
- Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при **600-800 об/мин** в течение **30 минут** при комнатной температуре.
- Используя автоматический вошер, промойте **5 раз** Промывочным буфером (**350 мкл/лунку**).
- Добавьте по **100 мкл** раствора стрептавидин-ферментного конъюгата в каждую ячейку, используя полуавтоматический диспенсер.
- Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при **600-800 об/мин** в течение **30 минут** при комнатной температуре.
- Используя автоматический вошер, промойте **5 раз** Промывочным буфером (**350 мкл/лунку**).
- Добавьте **100 мкл** хромогенного раствора ТМБ в каждую лунку, используя полуавтоматический диспенсер. Избегайте попадания прямых солнечных лучей.
- Инкубируйте при комнатной температуре в течение **8-12 минут** на орбитальном шейкере при **600-800 об/мин**.
Замечание: *Пожалуйста, контролируйте визуально развитие окраски для оптимизации времени инкубации.*
- Добавьте **100 мкл** стоп-реагента в каждую лунку, используя полуавтоматический диспенсер. Измерьте оптическую плотность ячеек при **450 нм**. Измерение оптической плотности микропланшета должно быть выполнено в течение **20 минут** после добавления стоп-реагента раствора.
Замечание: *Необходимо при считывании абсорбции программировать нулевой стандарт как «Бланк».*

РЕЗУЛЬТАТЫ

Замечание: *Результаты, приведенные в данной инструкции, были получены с помощью калибровочной кривой, аппроксимированной методом кубического сплайна, проведенной через точки, отложенные на логарифмических осях. Данные, полученные с помощью других методов, могут немного отличаться.*

- Оптимальные результаты могут быть получены при температуре инкубации **23 ± 2 °С**.
- Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца.
- Используя логарифмическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений среднего поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации AMN в нг/мл на горизонтальную ось X. Для расчета рекомендуется использовать аппроксимацию кубический сплайн.
- Определите концентрацию AMN в контролях и образцах из стандартной кривой, сравнивая рассчитанные средние значения поглощения с соответствующей концентрацией AMN.
- Все образцы со значениями, большими, чем у самого высокого стандарта, предварительно развести 0 нг/мл Калибратором А/Разбавителем Образцов и проанализировать повторно.
- Любые образцы со значениями ниже, чем у самого низкого стандарта, следует считать такими же.
- Умножьте результаты на фактор разведения, если это необходимо.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагенты, применяемые в этом наборе, оптимизированы для измерения уровня AMN в сыворотке и литий гепариновой плазме. Не

используйте для анализа реагенты, имеющие признаки микробной контаминации или содержащие осадок. Гетерофильные антитела, присутствующие в образце, могут мешать выполнению анализа.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Каждая лаборатория должна устанавливать свои собственные диапазоны нормальных значений.
- Контроли AMH/MIS ELISA или другие коммерческие контроли должны укладываться в установленные доверительные интервалы.
- Доверительные интервалы для контролей AMH/MIS напечатаны на калибровочной карте.
- Калибровочная кривая, низкий и высокий уровни контролей должны быть включены в каждый анализ.
- Раствор ТМБ должен быть бесцветным. Развитие голубой окраски может свидетельствовать о загрязненном или нестабильном реагенте.

ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Номер лунки	Содержимое лунки	Среднее, ОП	Конц., нг/мл
Калибраторы			
A1, A2	A	0.04 (бланк)	0
B1, B2	B	0.04	0.08
C1, C2	C	0.09	0.30
D1, D2	D	0.31	1.03
E1, E2	E	1.07	3.96
F1, F2	F	2.86	14.2

Предупреждение: вышеприведенные данные не должны быть использованы вместо данных, полученных в лаборатории.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Все аналитические характеристики представлены в нг/мл (1 нг/мл = 7.14 Pm)

Предел количественного определения:

Минимальное количество AMH/MIS, которое может быть детектировано в образце с 95% вероятностью (n=24) составила 0.023 нг/мл. Данное значение было определено при исследовании 5 образцов сыворотки с концентрацией AMH/MIS в диапазоне 0.03 – 0.346 нг/мл согласно рекомендациям CLSI EP17. В течение 2 дней было проведено 12 исследований образцов сыворотки в дублях.

Предел качественного определения:

Установленное минимальное количество при 20% погрешности составило 0.06 нг/мл. Данное значение было определено при исследовании 8 образцов в диапазоне 0.03 – 2.85 нг/мл согласно рекомендациям CLSI EP17. В течение 2 дней было проведено 12 исследований образцов сыворотки в дублях (n=24).

Воспроизводимость:

Воспроизводимость рассчитана при анализе трех пулов сыворотки. Исследование включало 12 постановок в 4 репликах каждое (n=48). Значения воспроизводимости были рассчитаны согласно рекомендациям NCCLS EP5-A и представлены в следующей таблице:

Образец	Значение (нг/мл)	Внутри серии		Между сериями		Общая	
		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

Линейность разведения:

Согласно рекомендациям NCCLS EP-6-P были проанализированы 3 образца сыворотки, содержащие различное количество AMH/MIS, разведенные Калибратором А/разбавитель образцов. Были рассчитаны % извлечения каждого образца:

Образец	Разведение	Ожидаемое значение (нг/мл)	Наблюдаемое значение (нг/мл)	% извлечения
1	--	7.39	--	--
	1:2	3.69	3.85	104%
	1:4	1.85	1.87	101%
	1:8	0.92	0.94	102%
	1:16	0.46	0.46	99%
2	--	4.44	--	--
	1:2	2.22	2.26	102%
	1:4	1.11	1.20	108%
	1:8	0.56	0.61	109%
	1:16	0.28	0.29	105%
3	--	7.11	--	--

1:2	3.55	3.89	109%
1:4	1.78	1.90	107%
1:8	0.89	0.99	111%
1:16	0.44	0.48	107%

Извлечение:

Известное количество AMH/MIS было добавлено в 3 образца сыворотки, содержащие различное количество AMH/MIS. Концентрация AMH/MIS была измерена до и после добавления и измерены % извлечения:

Образец	Добавленный AMH/MIS (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Наблюдаемое значение (нг/мл)	% извлечения
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%

Аналитическая специфичность:

Данная пара моноклональных антител, использованная в анализе, обнаруживает человеческий AMH/MIS.

Кросс-реагент	Концентрация (нг/мл)	% кросс-реактивности
Ингибин А	100	--
Ингибин В	100	--
Активин А	50	--
Активин В	50	--
Активин АВ	50	--
гAMH	130	--
Mature AMH	120	1.33
hAMH (Pro)	300	0.23
ProMature hAMH	110	100

Интерференция:

При добавлении в образцы сыворотки потенциально мешающих веществ (гемоглобин, триглицериды и билирубин) в концентрации в 2 раза превышающие физиологическое значение, концентрация AMH/MIS составила $\pm 10\%$ от контрольной. Исследование проведено согласно рекомендациям NCCLS EP7-P.

Вещество	Аналитическая концентрация (мг/мл)	Концентрация без добавки (нг/мл)	Концентрация с добавкой (нг/мл)	Разница, %
Гемоглобин	1.35	6.15	6.21	1.01
		4.67	4.62	-0.88
Триглицериды	5	6.15	6.33	2.98
		4.67	4.51	-3.37
Билирубин	0.6	4.86	4.80	-1.23
		3.11	3.08	-0.77

Ожидаемые значения:

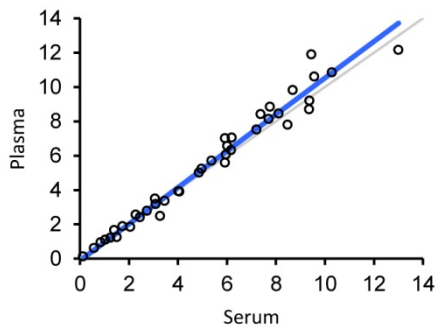
Диапазон ожидаемых значений был получен с использованием 90-95% непараметрического расчета с помощью Analyse-It для Microsoft Excel. Таблицу см. в оригинале инструкции.

Внимание: каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свой собственный диапазон нормальных значений. Результаты исследования должны учитываться вместе с клиническими данными.

Тип образца:

40 образцов сыворотки и литиевой плазмы в диапазоне 0.13 – 13.01 нг/мл были проанализированы с помощью данного метода. Результаты анализировали с помощью метода Passing Bablok.

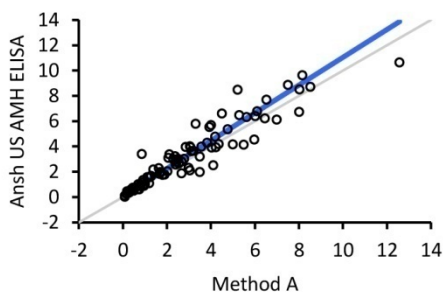
Плазма = 1.06 (сыворотка) – 0.10 (r = 0.995; P < 0.0001)



Сравнение методов:

Данный набор сравнили с другим коммерческим набором (метод А), используя 90 образцов сыворотки в диапазоне 0.1 – 12.58 нг/мл. Результаты анализировали с помощью метода Paasing Bablok.

Данный набор (AL-105) = 1.10(метод А) + 0.06 (r=0.98; P<0.0001)



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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