

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА (АМН)

A79765, AMH Gen II ELISA

Каталог. № : A79765
Количество : 96
Производитель: Beckman
Coulter, Inc., (США)

Методика от 06-2013



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор **AMH Gen II ELISA** предназначен для количественного определения Антимюллера гормона в сыворотке и литий гепаринизированной плазме человека. Данный метод предназначен для диагностики *in-vitro*.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ AMH Gen II ELISA основан на принципе ферментно-усиленного "двухступенчатого" сэндвич-иммуноанализа. При проведении анализа стандарты, контроли и образцы пациентов инкубируются в микропланшетных ячейках, покрытых антителами к АМН. После инкубации и промывки ячейки обрабатываются другими биотинилированными антителами к АМН. 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 превращенного ферментом субстрата путем измерения оптической плотности при длинах волн 450 и между 600 и 630 нм. Измеренное поглощение прямо пропорционально концентрации присутствующего АМН. Набор стандартов АМН используется для построения стандартной кривой поглощения, по которой могут быть рассчитаны неизвестные концентрации АМН в исследуемых образцах.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор содержит реагенты, достаточные для 96 анализов. Каждый набор содержит следующие реагенты:

Микрострипы с анти-АМН Gen II антителами:

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

АМН Gen II Разбавитель образцов:

- Один флакон 13 мл, содержит буфер с бычьим сывороточным альбумином (БСА), < 0.5 % ProClin 300 и азид натрия.
- Закрытый флакон хранится при 2-8 °C до указанного срока годности набора.

Конъюгат АМН Gen II антитело-Биотин:

- Готов к использованию.
- Один флакон, 13 мл, содержащий биотинированное анти-АМН антитело в белковом буфере (бычий, мышинный), < 0,3 % ProClin 300 и азид натрия.
- Хранить при 2-8°C до указанного срока хранения.

Конъюгат Стрептавидин-фермент:

- Готов к использованию.
- Один флакон, 13 мл, содержит конъюгат стрептавидин-HRP в белковом буфере (мышинный, рыбий) и < 10 % метанола.
- Хранить при 2-8°C до указанного срока годности.

Рабочий буфер:

- Один флакон, 13 мл буфера с БСА, белком (бычий, мышинный), < 0,3% ProClin 00 и азид натрия.
- Хранить при 2-8°C до указанного срока хранения.

ТМБ хромогенный раствор:

- Один флакон, 11 мл, содержит ТМБ в цитратном буфере с перекисью водорода.
- Хранить при 2-8°C до указанного срока хранения.

Концентрат промывочного буфера I:

- Один флакон, содержит 100 мл раствора буфера с неионным детергентом.
- Перед использованием разбавлять 10-кратно деионизированной водой.
- Хранить при 2-8°C или при комнатной температуре (~25°C) до указанного срока годности.

Стоп раствор А:

- Один флакон, 11 мл, содержащий 0.2 М серной кислоты.
- Хранить при 2-8°C до указанного срока хранения.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. **АМН Gen II A79766 Стандарты и контроли**
2. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450/405 нм с фильтрами сравнения 600-630 нм
3. Деионизированная вода
4. Пипетка, позволяющая измерить 10 - 1000 мкл
5. Автоматический микропланшетный вошер
6. Микропланшетный шейкер с возможностью установить скорость 600-800 об/мин
7. Вортекс
8. Фильтровальная бумага для высушивания стрипов
9. Логарифмическая бумага для ручного обсчета данных

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- **Для диагностики *in-vitro*.**
- Соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики (7).
- При соблюдении описанной процедуры риск работы с образцами и материалами, содержащими компоненты крови, минимален. Однако, со всеми материалами, содержащими компоненты крови, необходимо обращаться, как с потенциально опасными, соблюдая стандартные меры предосторожности и правила надлежащей лабораторной практики, вне зависимости от их происхождения, обработки и предшествующей сертификации (10). Используйте соответствующие дезинфектанты для обеззараживания. Храните и утилизируйте такие материалы и контейнеры для их хранения в соответствии с локальными правилами и рекомендациями.
- Азид натрия может взаимодействовать с медью и свинцом водопроводных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. При сливании реагентов промывайте водопроводную систему большим количеством воды для предотвращения накопления азидов (11).
- Xi: Раздражающее вещество: < 0.5 % ProClin 300.
R43: Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей.
S28-37: После контакта с кожей немедленно вымыть с мылом и большим количеством воды. Использовать перчатки.
- Xn: вредный: < 10 % метанола.
R20/21/22: Вреден при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании.
R68/20/21/22: Вреден: Возможен риск необратимых эффектов при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании.
S36/37: Использовать подходящую защитную одежду и перчатки.
S45: В случае инцидента или при плохом самочувствии, обратиться за медицинской помощью.
- Лист данных по безопасности материалов (MSDS) доступен по запросу.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ

- Рекомендуется использование сыворотки и литий гепаринизированной плазмы.
- Соблюдайте следующие рекомендации при обращении, тестировании и хранении образцов (12):
 - a) При заборе крови должны соблюдаться обычные меры предосторожности.
 - b) Позволить образцам сыворотки полностью стечь перед центрифугированием.
 - c) Хранить пробирки всегда закупоренными.
 - d) В течение 2 часов после центрифугирования, поместить минимум 500 мкл бесклеточного образца в пробирку для хранения. Немедленно закупорить пробирку.
 - e) Сыворотка и литий гепаринизированная плазма хранится при 2-8°C в течение 48 часов.
 - f) Если анализ не будет проведен в течение 48 часов или для транспортировки образцов, образцы должны быть заморожены при -20°C.

- При подготовке образцов придерживаться следующих правил:
- a) Убедиться, что остаточный фибрин и клеточный материал удалены перед тестированием.
- b) Следовать рекомендациям производителя по центрифугированию.
- Каждая лаборатория должна установить соответствие пробирок для забора образцов и продуктов для отделения сыворотки. Вариация этих продуктов может существовать между производителями и от партии к партии.
- Избегайте повторных циклов заморозки и оттаивания образцов.
- Не используйте для анализа сильно гемолизированные или липемичные образцы.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПОРЯДКУ РАБОТЫ

- Для успешного использования набора AMN Gen II ELISA 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.
- 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 загрязнения микроорганизмами реагентов, особенно концентрата конъюгата и разбавителя конъюгата.
- Избегайте загрязнения хромогенного раствора ТМБ ферментным конъюгатом.
- Используйте чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта, контроля и образца.
- Для добавления хромогенного раствора ТМБ и стоп-раствора не используйте пипетки с металлическими частями.
- Контейнеры и наконечники полуавтоматических пипеток, используемые для раствора ферментного конъюгата и хромогенного раствора ТМБ, при повторном использовании следует тщательно промывать дистиллированной водой до и после каждого использования. 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 воду высокого качества.
- Избегайте контакта реагентов с источниками тепла и прямым солнечным светом при хранении реагентов и во время инкубации.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовление реагентов:

1. Промывочный буфер

Разбавить 1 часть Промывочного концентрата с 9 частями деионизированной воды. Промывочный буфер стабилен один месяц при хранении при комнатной температуре в плотно закрытом сосуде.

2. Микроячейки

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° C) и тщательно перемешаны перед использованием осторожным переворачиванием. Стандарты, контроли и образцы пациентов должны анализироваться в дублях.

ПРИМЕЧАНИЕ: Все образцы сывороток с концентрацией аналита выше, чем концентрация самого высокого стандарта должны быть тщательно перемешаны и разведены раствором 0 нг/мл (Стандарт А) перед тестированием. Для образцов сывороток, взятых у детей: Разведите в соотношении 1:10 раствором 0 нг/мл (Стандарт А) перед тестированием.
Не разводите Стандарты или Контроли.

1. Пометьте стрипы, которые будут использоваться.
2. Внесите по 20 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте по 100 мкл раствора Рабочего буфера AMN в каждую ячейку, используя полуавтоматический диспенсер.
4. Инкубируйте в течение 1 часа при ~25°C на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин.
5. Приготовьте промывочный буфер как описано в главе «Приготовление реагентов».
6. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.

ПРИМЕЧАНИЕ: Настоятельно рекомендуется использовать автоматического микропланшетного промывочного устройства – вошера.

Замечание: Неполная промывка негативно влияет на правильность результатов. Если микропланшетный вошер недоступен, (а) полностью удалите жидкость из каждой ячейки, (б) внесите 400 мкл Промывочного буфера в каждую ячейку, и (в) повторите шаги (а) и (б) четыре раза. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.

7. Добавьте по 100 мкл раствора Биотинового конъюгата в каждую ячейку, используя полуавтоматический диспенсер.
8. Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин в течение 1 часа при ~25°C.
9. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером как указано в шаге 5 настоящего протокола. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.
10. Добавьте по 100 мкл раствора стрептавидин-ферментного конъюгата в каждую ячейку, используя полуавтоматический диспенсер.
11. Инкубируйте ячейки на орбитальном шейкере при 600-800 об/мин в течение 30 минут при ~25°C.
12. Используя автоматический вошер, промойте 5 раз Промывочным буфером как указано в шаге 5 настоящего протокола. Высушите планшет, перевернув его на фильтровальную бумагу.
13. Добавьте 100 мкл хромогенного раствора ТМБ в каждую лунку, используя полуавтоматический диспенсер. **Не подвергать прямым солнечным лучам.**
14. Инкубируйте при комнатной температуре ~25°C в течение 8-12 минут на орбитальном шейкере при 500-700 об/мин. Избегайте попадания прямого солнечного света.

Замечание: вы должны знать, что окраска может развиваться быстрее или медленнее рекомендованного времени инкубации, это зависит от конкретной комнатной температуры. Пожалуйста, контролируйте визуальное развитие окраски для оптимизации времени инкубации.

15. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, используя полуавтоматический диспенсер.
16. Измерьте оптическую плотность ячеек при 450 нм. Измерение оптической плотности микропланшета должно быть выполнено в течение 30 минут после добавления стоп-реагента раствора.

Замечание:

- i. Необходимо при считывании абсорбции программировать нулевой стандарт как «Бланк».
- ii. Если возможно измерение на двух длинах волн, используйте длину волны сравнения 600 или 630 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Используя логарифмическую бумагу, отметьте точки рассчитанных значений среднего поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации AMN на горизонтальную ось X, используйте линейную аппроксимацию. Альтернативно, для построения калибровочной кривой можно использовать линейные оси, а для расчета рекомендуется аппроксимация гладкий сплайн. Проведите оптимальную кривую, используя среднее двух измерений.
3. Определите концентрацию AMN в контролях и образцах из стандартной кривой, сравнивая рассчитанные средние значения поглощения с соответствующей концентрацией AMN .
4. Все образцы со значениями, большими, чем у самого высокого стандарта, предварительно развести стандартом А 0 нг/мл и проанализировать повторно. Для образцов сывороток, взятых у детей: Разведите в соотношении 1:10 раствором 0 нг/мл (Стандарт А) перед тестированием.
5. Любые образцы со значениями ниже, чем у самого низкого стандарта, следует считать такими же.

6. Умножить полученное значение на коэффициент разведения. *Примечание: Если полученная оптическая плотность превышает возможности ридера, необходимо второе считывание на 405 нм (фильтры сравнения 600 или 630). В этом случае постройте вторую стандартную кривую как описано выше по полученным значениям для всех стандартов при 405 нм. Концентрацию образцов, не вписывающихся в предыдущий масштаб, определите по новой стандартной кривой. Не заменяйте значения в пределах возможностей ридера, полученные при 450 нм, значениями, полученными при 405 нм.*

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Реагенты, применяемые в этом наборе, оптимизированы для измерения уровня АМН в сыворотке и литий гепаринизированной плазме.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания реагентов и образцов.
- Не используйте для анализа сильно гемолизированные или липемичные образцы, они могут дать ошибочные результаты.
- Результаты тестирования должны учитываться только в совокупности с другими имеющимися клиническими данными.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Контроли АМН Gen II ELISA или другие коммерческие контроли должны укладываться в установленные доверительные интервалы.
- Доверительные интервалы для контролей АМН Gen II ELISA напечатаны на этикетке флакона.
- 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.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

Образцы	Возраст (лет)	Концентрация (пг/мл)	2,5 – 97,5 процентиля (пг/мл)
Случайные мужчины (N=136)	38	5,7	1,3 – 14,8
Случайные женщины (N=95)	30	2,4	ND – 12,6
Женщины в клинике для больных бесплодием (N=100)	37	5,3	0,8 – 14,6
Женщины на 3-й день цикла (N=106)	-	1,5	ND – 10,6
Женщины после менопаузы (N=45)*	71	ND	ND
Мальчики (N=36)**	4,8	56,3	3,8 – 159,8
Девочки (N=36)	5,0	1,3	ND – 8,9

ND – недетектируемо

ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Номер лунки	Содержимое лунки	Среднее, ОП	Конц., нг/мл
	стандарты		
A1, A2	A	бланк	0
B1, B2	B	0.019	0.16
C1, C2	C	0.053	0.4
D1, D2	D	0.017	1.2
E1, E2	E	0.057	4.0
F1, F2	F	1.47	10.0
G1, G2	G	3.11	22.5

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

ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Все представленные характеристики выражены в нг/мл. Для перевода в SI единицы:

$$1 \text{ нг/мл} = 7,14 \text{ pM}$$

Сравнение методов

АМН Gen II ELISA сравнивался с другим коммерчески доступным методом (метод X). 119 образцов мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет были проанализированы и получены следующие результаты:

Регрессия:

A. АМН Gen II СЫВОРОТКА = 1.0 (метод X)
($r = 0.98$; $97.5\% \text{ CI} = 0.95-0.98$, $P < 0.0001$)

B. АМН Gen II ПЛАЗМА = 0.967 (метод X)
($r = 0.98$; $97.5\% \text{ CI} = 0.95-0.98$, $P < 0.0001$)
Рисунки (См. оригинал инструкции).

Восстановление разведения (Линейность)

Четыре образца человеческой сыворотки были разбавлены нулевым стандартом АМН и исследованы.

Образец	Разбавление	Ожидаемая конц. (нг/мл)	Наблюдаемая конц. (нг/мл)	% от восстановления
I	---	4,94	N/A	N/A
	1 : 2	2,47	2,66	108
	1 : 4	1,24	1,37	110
	1 : 8	0,62	0,63	102
	1 : 16	0,31	0,26	84
II	---	6,47	N/A	N/A
	1 : 2	3,24	3,46	107
	1 : 4	1,62	1,77	109
	1 : 8	0,81	0,88	109
	1 : 16	0,41	0,37	90
III	---	10,34	N/A	N/A
	1 : 2	5,17	5,23	101
	1 : 4	2,58	2,59	100
	1 : 8	1,29	1,34	104
	1 : 16	0,65	0,59	91
IV	---	12,86	N/A	N/A
	1 : 2	6,43	6,36	99
	1 : 4	3,22	3,11	97
	1 : 8	1,61	1,58	98
	1 : 16	0,80	0,68	85

Восстановление после спайка

Добавление 3 разных уровней АМН Gen II к 4 образцам пациентов с низкой концентрацией АМН Gen II дало следующие результаты:

Образец	Эндогенная конц.	Ожидаемая конц. (нг/мл)	Наблюдаемая конц. (нг/мл)	% восстановления
I	0.67	1.97	1.96	99
		3.16	3.20	101
		4.24	4.45	105
II	1.16	2.44	2.53	104
		3.60	3.81	106
		4.66	5.01	107
III	2.21	3.44	3.86	112
		4.55	4.48	98
		5.57	5.69	102
IV	1.47	2.73	2.77	101
		3.88	3.87	100
		4.93	5.07	103

Неточность

Воспроизводимость АМН Gen II ELISA была определена с использованием 2 контролей (Q1, Q2) и 2 контролей (C1,C2) с 2 партиями реагентов. Анализ состоял из 40 исследований, 4 дубля каждый.

Образец	Средняя конц.	Внутри анализа	Между анализами	Всего
	Нг/мл	% CV	% CV	% CV
Q1	4.42	5.4	5.6	7.7
Q2	14.03	3.6	4.5	5.8
Q3	3.82	3.7	4.4	5.7
Q4	16.45	3.4	4.0	5.3

Аналитическая специфичность

Антитела, используемые для анализа, связываются с зоной АМН которая более стабильна к протеолизу, чем область прогормона. Эта пара специфична для АМН и не обнаруживает ингибин А, активин А, FSH и LH при их двойной концентрации.

Интерференция

При добавлении потенциальных интерферирующих веществ (гемоглобина, триглицеридов и билирубина) в двойной концентрации, концентрации АМН были в пределах $\pm 10\%$ контрольных границ, как представлено в таблице:

Интерферирующие вещества	Конц. аналит	Неразбавленный образец (нг/мл)	Разбавленный образец (нг/мл)	% разницы от контрольного
Гемоглобин	2 мг/мл	2.85	2.96	3.9
Триглицериды	20 мг/мл	2.48	2.31	- 6.9
Билирубин	0.6 мг/мл	2.5	2.51	0.4

Предел обнаружения (LoD)

Наименьшее количество AMH в образце, которое может быть обнаружено с 95% вероятностью составляет 0,08 нг/мл. Значение определялось на основании обработки семи точек калибровочной кривой, контролей и семи образцов сыворотки человека в диапазоне от нуля до 1,5 нг/мл. Два анализа в день проводили в течение 10 дней в дублях.

Предел количественного определения (LOQ)

Оценочная минимальная доза достигает при 20% общей погрешности 0,16 нг/мл. Значение определялось на основании обработки семи точек калибровочной кривой, контролей и восьми образцов сыворотки человека, по крайней мере два образца, которые были менее чем медиана нормального и не менее трех образцов, которые были больше, чем средняя норма более 20 постановок и 10 дней в дублях.



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