

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНУ (АМН)

A79765, АМН Gen II ELISA

Каталог. №: A79765

Методика від 08-2015

Кількість : 96

Виробник : Beckman Coulter, Inc.,
(США)



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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір АМН Gen II ELISA призначений для кількісного визначення антимюллерова гормону в сироватці і літій гепариновій плазмі людини. Даний метод призначений для діагностики *in-vitro*.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Аналіз АМН Gen II ELISA заснований на принципі ферментно-посиленого "двоступеневого" сендвіч-імуноаналізу. При проведенні аналізу стандарти, контролю і зразки пацієнтів інкубуються в мікропланшетних лунках, покритих антитілами до АМН. Після інкубації і промивання лунки обробляються іншими біотинильованими антитілами до АМН. Після другої інкубації і наступного промивання додається стрептавідин, кон'югований з пероксидазою хрому. Після третьої інкубації і наступного промивання лунки інкубуються з субстратом ТМБ. Потім додається стоп-розчин, визначається кількість перетвореного ферментом субстрату шляхом вимірювання оптичної щільності при довжинах хвиль 450 і між 600 і 630 нм.

Виміряне поглинання прямо пропорційно концентрації присутнього АМН. Набір стандартів АМН використовується для побудови стандартної кривої поглинання, за якою можуть бути розраховані невідомі концентрації АМН в досліджуваних зразках.

МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Мікросмужки з анти-АМН Gen II антитілами:

- Один тримач смужок, що містить 96 мікролунок, покритих мишачим моноклональним анти-АМН IgG, іммобілізованими на внутрішніх стінках лунок.
- Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності в закритому пакеті, який захищається від вологи.

АМН Gen II Розчинник для зразків:

- Один флакон 13 мл, містить буфер з бичачим сироватковим альбуміном (БСА), < 0.5% ProClin 300 і азид натрію.
- Закритий флакон зберігається при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності набору.

Кон'югат АМН Gen II антитіло-Біотин:

- Готовий до використання.
- Один флакон, 13 мл, що містить біотинильоване анти-АМН антитіло в білковому буфері (бичачий, мишачий), < 0.3% ProClin 300 і азид натрію.
- Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

Кон'югат Стрептавідин-фермент:

- Готовий до використання.
- Один флакон, 13 мл, містить кон'югат стрептавідин-HRP в білковому буфері (мишачий, риб'ячий) і < 10% метанолу.
- Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності.

Робочий буфер:

- Два флакона, 13 мл буфера з БСА, білком (бичачий, мишачий), < 0.3% ProClin 300 і азид натрію.
- Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

ТМБ хромогенний розчин:

- Один флакон, 11 мл, містить ТМБ в цитратному буфері з перекисом водню.
- Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

Концентрат Промивного буфера I:

- Один флакон, містить 100 мл розчину буфера з неіонним детергентом.
- Перед використанням розбавляти 10-кратно деіонізованою водою.
- Зберігати при 2-8 °С або при кімнатній температурі (25 °С) до зазначеного терміну придатності.

Стоп розчин А:

- Один флакон, 11 мл, містить 0.2 М сірчаної кислоти.
- Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. АМН Gen II A79766 Стандарти і контролю
2. Пробірка відповідного розміру (для попереднього перемішування зразка).
3. Мікропланшетний рідер, здатний проводити вимірювання при 450/405 нм з фільтрами порівняння 600-630 нм.
4. Деіонізована вода
5. Піпетка, що дозволяє виміряти 10 - 1000 мкл
6. Автоматичний мікропланшетний вошер
7. Мікропланшетний шейкер з можливістю встановити швидкість 600-800 об./хв.
8. Вортекс
9. Фільтрувальний папір для висушування стрипів
10. Логарифмічний папір для ручного обрахунку даних

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- Для діагностики *in-vitro*.
- Дотримуйтеся правил належної лабораторної практики (7).
- При дотриманні описаної процедури ризик роботи зі зразками і матеріалами, що містять компоненти крові, мінімальний. Однак, з усіма матеріалами, що містять компоненти крові, необхідно звертатися, як з потенційно небезпечними, дотримуючись стандартних запобіжних заходів і правил належної лабораторної практики, незалежно від їх походження, обробки і попередньої сертифікації (10). Використовуйте відповідні дезінфектанти для знезараження. Зберігайте і утилізуйте такі матеріали і контейнери для їх зберігання відповідно до локальних правил та рекомендацій.
- Азид натрію може взаємодіяти з міддю і свинцем водопровідних труб, утворюючи вибухонебезпечні азиди металів. При зливанні реагентів промивайте водопровідну систему великою кількістю води для запобігання накопичення азиду (11).
- Xi: Подразнююча речовина: < 0.5% ProClin 300.
R43: Може викликати алергічну реакцію при контакті зі шкірою.
S28-37: Після контакту зі шкірою негайно вимити з милом і великою кількістю води, Використовувати рукавички.
- Xn: шкідливий: < 10% метанолу.
R20/21/22: Шкідлива при вдиханні, при контакті зі шкірою і проковтнувши.
R68/20/21/22: Шкідлива: Можливий ризик незворотних ефектів при вдиханні, при контакті зі шкірою і при ковтанні.
S36/37: Використовувати відповідний захисний одяг і рукавички.
S45: У випадку інциденту або при поганому самопочутті, звернутися за медичною допомогою.
- Лист даних з безпеки матеріалів (MSDS) доступний за запитом.

ЗБІР ЗРАЗКІВ І ПРИГОТУВАННЯ

- Рекомендується використання сироватки і літій гепаринової плазми.
- Дотримуйтеся наступних рекомендацій при роботі, тестуванні та зберіганні зразків (12):
 - a) При заборі крові необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів.
 - b) Дозволити зразкам сироватки повністю згуститися перед центрифугуванням.
 - c) Зберігати пробірки завжди закупореними.
 - d) Протягом 2 годин після центрифугування помістити мінімум 500 мкл безклітинного зразка в пробірку для зберігання. Негайно закупорити пробірку.
 - e) Сироватка і літій гепаринова плазма зберігаються при 2-8 °С протягом 48 годин.
 - f) Якщо аналіз не буде проведений протягом 48 годин або для транспортування зразків зразки повинні бути заморожені при -20 °С.
- При підготовці зразків дотримуватися наступних правил:
 - a) Переконайтеся, що залишковий фібрин і клітинний матеріал видалені перед тестуванням.
 - b) Дотримуватись рекомендацій виробника щодо центрифугування.
- Кожна лабораторія повинна встановити відповідність пробірок для забору зразків і продуктів для відділення сироватки.

Варіація цих продуктів може існувати між виробниками і від партії до партії.

- Уникайте повторних циклів заморожування і відтавання зразків.
- Не використовуйте для аналізу сильно гемолізовані або ліпемічні зразки.

ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПОРЯДКУ РОБОТИ

- Для успішного використання набору AMH Gen II ELISA необхідно повне розуміння вкладеної інструкції.
- Правильні результати будуть отримані тільки при використанні точної лабораторної техніки та акуратному виконанні інструкції.
- Стандартна крива повинна бути включена в кожне визначення.
- Перед використанням витримайте всі реагенти при кімнатній температурі (~ 25 °C).
- Ретельно перемішайте всі реагенти і зразки перед використанням, обережно перевертаючи.
- Не змішуйте різні лоти і реагенти з різних лотів.
- Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном зберігання.
- Неповна промивка негативно впливає на точність результатів.
- Щоб звести до мінімуму можливі варіації через різний час інкубації з субстратом, додавайте стоп-розчин в лунки в тій же послідовності і з такою ж швидкістю, як і розчин ТМБ.
- Уникайте забруднення мікроорганізмами реагентів, особливо концентрату кон'югату і розріджувача кон'югату.
- Уникайте забруднення хромогенного розчину ТМБ ферментним кон'югатом.
- Використовуйте чисті одноразові наконечники для кожного реагенту, стандарту, контролю та зразка.
- Щоб додати хромогенний розчин ТМБ і стоп-розчин не використовуйте піпетки з металевими частинами.
- Контейнери та наконечники напівавтоматичних піпеток, використовуваних для розчину ферментного кон'югату і хромогенного розчину ТМБ, при повторному використанні слід ретельно промивати дистильованою водою до і після кожного використання. Фермент, який використовується як мітка, інертний до кисню і вкрай чутливий до мікробіологічних забруднень, хлорноватистої кислоти, азиду натрію і ароматичним хлорогідрокarbonатам, які часто знаходяться у воді.
- Використовуйте воду високої якості.
- Уникайте контакту реагентів з джерелами тепла і прямим сонячним світлом при зберіганні реагентів і під час інкубації.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Приготування реагентів

1. Промивний буфер

Розбавити 1 частину промивального концентрату з 9 частинами деіонізованої води. Промивний буфер стабільний один місяць при зберіганні при кімнатній температурі в щільно закритій посудині.

2. Мікролунки

Виберіть необхідну для аналізу кількість щеплених лунок. Поверніть зайві лунки в пакет з осушувачем. Пакет повинен бути захищеним від вологи.

Проведення аналізу

Всі реагенти та зразки перед початком аналізу повинні бути витримані при кімнатній температурі (~ 25 °C) і ретельно перемішані перед використанням обережним перевертанням. Стандарти, контролю і зразки пацієнтів повинні аналізуватися в дубляж.

ПРИМІТКА: Всі зразки сироваток з концентрацією аналіту вище, ніж концентрація найвищого стандарту, повинні бути ретельно перемішані і розведені Розчинником для зразків перед тестуванням. Для зразків сироваток, взятих у дітей (хлопчики): Розведіть 1 частину зразка з 9 частинами Розчинника для зразків перед тестуванням. Не розводьте Стандарти або Контролі.

1. Перед внесення зразка на мікропланшет приготувати всі калібратори, контролю і зразки з **Робочим Буфером**. У пробірці для зразка приготувати 1 частину кожного калібратора, контролю або зразка відповідно (включаючи розведений зразок дитини) з 5 частинами Робочого Буфера (наприклад, 60 мкл калібратора, контролю або зразка + 300 мкл Робочого Буфера). Перемішати ретельно.
- ЗАУВАЖЕННЯ: це підготовка калібраторів, контролю та зразків з Робочим Буфером. Коефіцієнт розведення не використовується.**
2. Позначте стрипи, які будуть використані.
3. Протягом 1 години внесіть по 120 мкл підготовлених стандартів, контролю і зразків у відповідні лунки планшета, використовуючи точну піпетку.
4. Інкубуйте лунки протягом 1 години при ~ 25 °C на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв.

5. Приготуйте промивний буфер як описано в розділі «Приготування реагентів».
6. Використовуючи автоматичний вошер, промийте 5 разів промивальним буфером. Висушіть планшет, перевернувши його на фільтрувальний папір.
ПРИМІТКА: Настійно рекомендується використання автоматичного мікропланшетного промивного пристрою - вошера. Зауваження: Неповна промивка негативно впливає на правильність результатів. Якщо мікропланшетний вошер недоступний,
 - a) повністю видаліть рідину з кожної лунки,
 - b) внесіть 400 мкл промивного буфера в кожну лунку,
 - c) аспіруйте рідину знову
 - d) повторіть кроки (b) і (c) чотири рази..
7. Додайте по 100 мкл розчину Біотинового кон'югату в кожну лунку, використовуючи точну піпетку.
8. Інкубуйте лунки на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв. протягом 1 години при 25 °C.
9. Використовуючи автоматичний вошер, промийте 5 разів промивальним буфером. Висушіть планшет, перевернувши його на фільтрувальний папір.
10. Додайте по 100 мкл розчину стрептавідин-ферментного кон'югату в кожну лунку, використовуючи точну піпетку.
11. Інкубуйте лунки на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв. протягом 30 хвилин при 25 °C.
12. Використовуючи автоматичний вошер, промийте 5 разів промивальним буфером. Висушіть планшет, перевернувши його на фільтрувальний папір.
13. Додайте 100 мкл хромогенного розчину ТМБ в кожну лунку, використовуючи точну піпетку.
- Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.**
14. Інкубуйте при кімнатній температурі ~ 25 °C протягом 8-12 хвилин на орбітальному шейкері при 600-800 об/хв.
Примітка: ви повинні знати, що забарвлення може розвиватися швидше або повільніше рекомендованого часу інкубації, це залежить від конкретної кімнатної температури. Будь ласка, контролюйте візуально розвиток забарвлення для оптимізації часу інкубації.
15. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку, використовуючи точну піпетку.
16. Виміряйте оптичну щільність лунок при 450 нм. Вимірювання оптичної щільності мікропланшетів повинно бути виконано протягом 30 хвилин після додавання розчину стоп-реагенту.

Примітка:

- i. Необхідно при зчитуванні абсорбції програмувати нульовий стандарт як «Бланк».
- ii. Якщо можливо проводити вимір на двох довжинах хвиль, використовуйте довжину хвилі порівняння 600 або 630 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ

1. Розрахуйте середнє значення поглинання для кожного стандарту, контролю та зразка.
2. Відняти середнє значення ОЩ Калібратора А від середнього значення ОЩ калібраторів В-Г, контролю та зразків. Використовуючи логарифмічний папір, відкладіть точки розрахованих значень середнього поглинання калібраторів на вертикальну вісь Y, а відповідні концентрації АМН на горизонтальну вісь X в нг/мл. Проведіть оптимальну криву, використовуючи середнє двох вимірів.
3. Визначте концентрацію АМН в контролях і зразках зі стандартної кривої, порівнюючи розраховані середні значення поглинання з відповідною концентрацією АМН.
4. Всі зразки зі значеннями, більшими, ніж у самого високого стандарту, попередньо розвести Розчинником для зразків і проаналізувати повторно. Для зразків сироваток, взятих у дітей: Розведіть 1 частину зразка з 9 частинами Розчинника для зразків перед тестуванням.
5. Будь-які зразки зі значеннями нижче, ніж аналітична чутливість, слід вважати такими ж.
6. Помножити отримане значення на коефіцієнт розведення.
Примітка: Якщо отримана оптична щільність перевищує можливості рідера, необхідне друге зчитування на 405 нм (фільтри порівняння 600 або 630). У цьому випадку побудуйте другу стандартну криву як описано вище за отриманими значеннями для всіх стандартів при 405 нм. Концентрацію зразків, що не вписуються в попередній масштаб, визначте за новою стандартною кривою. Не замінійте значення в межах можливостей рідера, отримані при 450 нм, значеннями, отриманими при 405 нм.

ОБМЕЖЕННЯ

- Реагенти, які застосовуються в цьому наборі, оптимізовані для вимірювання рівня АМН в сироватці і літій гепариновій плазмі.

- Уникайте повторного заморожування і розморожування реагентів і зразків.
- Не використовуйте для аналізу сильно гемолізовані або ліпемічні зразки, вони можуть дати помилкові результати.
- Результати тестування повинні враховуватися тільки в сукупності з іншими наявними клінічними даними.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Контролі AMH Gen II ELISA або інші комерційні контролю повинні знаходитися в межах встановлених довірчих інтервалів.
- Довірчі інтервали для контролів AMH Gen II ELISA надруковані на етикетці флакона.
- Низький і високий рівні контролів повинні бути включені в кожен аналіз.
- Розчин ТМБ має бути безбарвним. Розвиток блакитного забарвлення може свідчити про забруднений або нестабільний реагент.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Кожна лабораторія повинна встановлювати свої діапазони нормальних значень.

Зразки	Вік (років)	Концентрація (нг/мл)	2,5 – 97,5 процентиля (нг/мл)
Випадкові чоловіки (N=136)	38	5,7	1,3 – 14,8
Випадкові жінки (N=95)	30	2,4	ND – 12,6
Жінки в клініці для хворих безпліддям (N=100)	37	5,3	0,8 – 14,6
Жінки на 3-й день циклу (N=106)	-	1,5	ND – 10,6
Жінки після менопаузи (N=45)*	71	ND	ND
Хлопчики (N=36)**	4,8	56,3	3,8 – 159,8
Дівчата (N=36)	5,0	1,3	ND – 8,9

ND – не визначається

ПРИКЛАД СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ

Номер лунки	Вміст лунки	Середнє, ОП	Конц., нг/мл
	стандарт		
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

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: вищевказані дані не повинні бути використані замість даних, отриманих в лабораторії.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Всі представлені характеристики виражені в нг/мл. Для переведення в SI одиниці:

$$1 \text{ нг/мл} = 7.14 \text{ pM}$$

Порівняння методів

AMH Gen II ELISA порівнювався з іншим комерційно доступним методом (метод X). 119 зразків чоловіків і жінок у віці 20-50 років були проаналізовані та отримані наступні результати:

Регресія:

A. AMH Gen II СИРОВАТКА = 1.0 (метод X)
($r = 0.98$; 97.5 % CI = 0.95-0.98, $P < 0.0001$)

B. AMH Gen II ПЛАЗМА = 0.967 (метод X)
($r = 0.98$; 97.5 % CI = 0.95-0.98, $P < 0.0001$)

Малюнки (Див. оригінал інструкції).

Відновлення розведення (Лінійність)

Чотири зразки людської сироватки були розбавлені нульовим стандартом AMH і досліджені.

Зразок	Розведення	Очікувана конц. (нг/мл)	Отримана конц. (нг/мл)	% відновлення
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

Відновлення після спайка

Додавання 3 різних рівнів AMH Gen II до 4 зразків пацієнтів з низькою концентрацією AMH Gen II дало наступні результати:

Зразок	Ендогенна конц.	Очікувана конц. (нг/мл)	Отримана конц. (нг/мл)	% відновлення
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

Неточність

Відтворюваність AMH Gen II ELISA була визначена з використанням 2 контролів (Q1, Q2) і 2 контролів (C1, C2) з 2 партіями реагентів. Аналіз складався з 40 досліджень, 4 дубля кожного.

Зразок	Середня конц.	В аналізі	Між аналізами	Разом
	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

Аналітична специфічність

Антитіла, що використовуються для аналізу, зв'язуються з зоною AMH, яка більш стабільна до протеолізу, ніж область прогормона. Ця пара специфічна для AMH і не виявляє інгібін А, активін А, FSH і LH при їх подвійній концентрації.

Інтерференція

При додаванні потенційних інтерферуючих речовин (гемоглобін, тригліцеридів і білірубін) в подвійній концентрації, концентрації AMH були в межах $\pm 10\%$ контрольних меж, як представлено в таблиці:

Інтерферуючі речовини	Концентрація аналіта	Нерозбавлений зразок (нг/мл)	Розбавлений зразок (нг/мл)	% різниці від контрольного
Гемоглобін	2 мг/мл	2.85	2.96	3.9
Тригліцериди	20 мг/мл	2.48	2.31	- 6.9
Білірубін	0.6 мг/мл	2.5	2.51	0.4

Межа виявлення (LoD)

Найменша кількість AMH в зразку, яка може бути виявлена з 95% ймовірністю становить 0.08 нг/мл. Значення визначалося на підставі обробки семи точок калібрувальної кривої, контролів і семи зразків сироватки людини в діапазоні від нуля до 1.5 нг/мл. Два аналізу в день проводили протягом 10 днів в дублях.

Межа кількісного визначення (LoQ)

Оціночна мінімальна доза досягає при 20% загальної похибки 0.16 нг/мл. Значення визначалося на підставі обробки семи точок калібрувальної кривої, контролів і восьми зразків сироватки людини, принаймні, два зразка, які були менш ніж медіана нормального і не менше трьох зразків, які були більше, ніж середня норма більше 20 постановок і 10 днів в дублях.



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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