

**НАБІР ІФА**  
**ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ MIS/AMH**  
**(АНТИМЮЛЛЕРІВ ГОРМОН/  
ФАКТОР РЕГРЕСІЇ МЮЛЛЕРОВОГО  
КАНАЛУ)**

**AL-105-i, UltraSensitive AMH/MIS ELISA**

Каталог. № : **AL-105-i**  
Виробник : **AnshLabs, (США)**

Методика від **11-07-2014**  
Версія **07**



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

**ПРИЗНАЧЕННЯ**

Даний набір містить матеріали для кількісного виміру MIS/AMH в людській сироватці, плазмі та інших біологічних рідинах. Тільки для діагностики *in vitro*.

**КОРОТКИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ**

(Див. оригінал інструкції).

**ПРИНЦИП МЕТОДУ**

В даному наборі використовується принцип ферментно-посиленого "треступінчатого" сендвіч-імуноаналізу. При проведенні аналізу стандарти, контролю і зразки пацієнтів інкубуються в мікропланшетних лунках, покритих антитілами до MIS/AMH. Після інкубації і промивання лунки обробляються іншими біотинильованими антитілами до MIS/AMH. 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 двох довжинах хвиль 450 і 630 нм. Виміряне поглинання прямо пропорційно концентрації присутнього MIS/AMH. Набір стандартів MIS/AMH використовується для побудови стандартної кривої поглинання, за якою можуть бути розраховані невідомі концентрації MIS/AMH в досліджуваних зразках.

**РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ**

**CAL-105A AMH/MIS Калібратор А/Розчинник зразків:**

Один флакон 11 мл, містить 0 нг/мл AMH у білковому буфері і ProClin 400. Закритий флакон зберігається при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності набору.

**CAL-105B – CAL-105F AMH/MIS Калібратори В-F (ліофілізовані):**

П'ять флаконів, містять приблизно 0.09-15.0 нг/мл AMH у білковому буфері і Pro-Mullerian Clean 400. Точні концентрації вказані в калібрувальній карті. Закриті флакони зберігаються при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності набору. Розведіть калібратори В-F в 1 мл деіонізованої води. Ретельно перемішайте. Для багаторазового використання аліквотуйте і заморозьте. Альтернативно, заморозьте в тій же пробірці протягом 2 годин після відновлення. Уникайте повторних циклів заморожування/відтавання.

**CTR-105-I – CTR-105-II AMH/MIS Контролі I та II (ліофілізовані):**

Два флакона, містять контроль високого і низького рівнів у білковому буфері і ProClean 400. Точні концентрації вказані в калібрувальній карті. Закриті флакони зберігаються при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності набору. Розведіть Контролі I і II в 1 мл деіонізованої води. Ретельно перемішайте. Для багаторазового використання аліквотуйте і заморозьте. Альтернативно, заморозьте в тій же пробірці протягом 2 годин після відновлення. Уникайте повторних циклів заморожування/відтавання.

**PLT-105 Мікростріпи з сорбованими анти-AMH антитілами:**

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

**ASB-205 AMH/MIS Робочий буфер:**

Один флакон 12 мл, містить білковий буфер з БСА з консервантом, що не містить ртуті. Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

**BCR-105 Кон'югат біотинильованих анти-AMH антитіл (готовий для використання):**

Один флакон, що містить 12 мл анти-AMH антитіл, кон'югованих з біотином в білковому буфері з консервантом, що не містить ртуті. Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

**SAR-105 Кон'югат стрептавідин/фермент (готовий для використання):**

Один флакон 12 мл, містить кон'югат стрептавідин-HRP в білковому буфері з консервантом, що не містить ртуті. Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну придатності.

**TMB-100 ТМБ хромогенний розчин:**

Один флакон, що містить 12 мл ТМБ в буфері з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Зберігати при 2-8 °С до зазначеного терміну зберігання.

**STP-100 Стоп розчин:**

Один флакон, 12 мл, що містить 0.2 М сірчаної кислоти. Зберігати при 2-30 °С до зазначеного терміну зберігання.

**WSH-100 Концентрат промивного буфера А:**

Один флакон, містить 60 мл розчину сольового буфера з неіонним детергентом. Зберігати при 2-30 °С до зазначеного терміну придатності. Перед використанням розбавляти 25-кратно деіонізованою водою.

**НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ**

1. Мікропланшетний рідер, здатний проводити вимірювання при 450, 405 і 630 нм.
2. Мікропланшетний орбітальний шейкер.
3. Автоматичний мікропланшетний вошер.
4. Напіваавтоматичні/ручні мікродозатори на 10-250 мкл.
5. Піпетка-репітер.
6. Вортекс.
7. Деіонізована вода.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

**Для діагностики *in vitro*.**

- a) При роботі дотримуйтесь правил належної лабораторної практики.
- b) Використовуйте одноразові рукавички та окуляри при роботі з компонентами набору.
- c) Реагенти та компоненти набору необхідно утилізувати, керуючись встановленими правилами.

**УВАГА: Потенційно Біологічно Небезпечний Матеріал**

Цей набір може містити реагенти, приготовані з людської сироватки або плазми. Використані сироватка або плазма тестувалися методом, затвердженим FDA, і знайдено, що вони не містять антитіл до ВІЛ-1/2, HCV і HBsAg. Тим не менш, так як не існує методу, що дає повну гарантію відсутності ВІЛ, HCV, вірусу гепатиту В або яких-небудь інших інфекційних агентів, то з даними реагентами треба поводитись дотримуючись біологічної безпеки 2-го рівня, як рекомендується при роботі з потенційно інфекційно-небезпечним людським матеріалом, як це описано в керівництві «Біологічна безпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях» Центру контролю захворюваності/Національного Інституту Здоров'я, 5-е видання, 2007.

**УВАГА: Потенційно Хімічно Небезпечний Матеріал**

Деякі компоненти набору містять Проклін 400 і азид натрію в якості консерванту, які в концентрованому вигляді є подразнючими шкіру та слизові оболонки речовинами. В реагентах вони присутні в розведеному вигляді, що значно знижує ризик при контакті, але не повністю. Уникайте контакту зі шкірою, слизовими, одягом. При попаданні промивайте великою кількістю води і звертайтеся до лікаря за консультацією. Змивайте відходи великою кількістю води для запобігання накопичення небезпечних хімічних речовин в каналізаційній системі.

**ЗБІР ЗРАЗКІВ І ПРИГОТУВАННЯ**

- a) Для аналізу рекомендується використовувати сироватку і літій-гепаринову плазму.
- b) Рекомендації щодо збору, приготування та зберігання зразків крові залежать від типу використовуваних пробірок. Використовувати згідно з інструкціями виробника. Кожна лабораторія повинна використовувати свої власні пробірки для збору зразків і засоби для відділення сироватки.
- c) Якщо зразки будуть використовуватися протягом 24 годин, їх можна зберігати при 4 °С. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при -20 °С або -80 °С, щоб уникнути втрати активності.
- d) Не використовуйте для аналізу сильно гемолізовані або ліпемічні зразки.

- е) Уникайте повторних циклів заморожування і розморожування зразків. Допустимо не більше 3 циклів відтавання.

### ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПОРЯДКУ ПРОВЕДЕННЯ РОБОТИ

- Для успішного використання набору 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 все 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.
- Використовуйте чисті одноразові наконечники для кожного реагенту, стандарту, контролю та зразка. Уникайте забруднення мікроорганізмами реагентів, забруднення розчину ТМБ кон'югатом. Фермент, який використовується як мітка, інертний до кисню і вкрай чутливий до мікробіологічних забруднень, хлорноватистої кислоти, азиду натрію і ароматичних хлорогідрокarbonатів, які часто знаходяться у воді. Використовуйте деіонізовану воду.
- Неповна промивка негативно впливає на точність результатів. Щоб звести до мінімуму можливі варіації через різного часу інкубації з субстратом, додавайте стоп розчин в осередку в той же послідовності і з такою ж швидкістю, як і розчин ТМБ. Уникайте контакту реагентів з джерелами тепла і прямим сонячним світлом при зберіганні реагентів і під час інкубації.

### ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

- AMH/MIS Калібратори В-Ф і контролю:** розведіть калібратори В-Ф і контролю в 1 мл деіонізованої води кожен. Ретельно перемішайте.
- Промивний буфер:** розчин промивного буфера готується 25-кратним розведенням деіонізованою водою концентрату промивного буфера. Промивний буфер стабільний один місяць при зберіганні при кімнатній температурі в щільно закритій посудині.
- Мікролунки:** виберіть необхідну для аналізу кількість привитих 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 дублях.

**УВАГА:** *Всі зразки сироватки з концентрацією аналіту вище, ніж концентрація найвищого стандарту, повинні бути ретельно перемішані і розведені розчином 0 нг/мл (Стандарт А/Розріджувач зразків) перед тестуванням.*

- Розведіть калібратори В-Ф і контролю в 1 мл деіонізованої води. Дайте їм розчинитися протягом **10 хвилин**. Ретельно перемішайте.
  - Позначте стрипи, які будуть використані.
  - Внесіть по **25 мкл** стандартів, контролів і зразків у відповідні лунки планшета.
  - Додайте по **100 мкл** розчину AMH/MIS Робочого буфера в кожну лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер.
  - Інкубуйте протягом **90 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному шейкері при **600-800 об/хв**.
  - Використовуючи автоматичний вошер, промийте **5 разів** промивальним буфером (**350 мкл/лунку**).
  - Додайте по **100 мкл** розчину Біотинового кон'югату в кожну лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер.
  - Інкубуйте лунки на орбітальному шейкері при **600-800 об/хв** протягом **30 хвилин** при кімнатній температурі.
  - Використовуючи автоматичний вошер, промийте **5 разів** промивальним буфером (**350 мкл/лунку**).
  - Додайте по **100 мкл** розчину стрептавідин-ферментний кон'югат в кожну лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер.
  - Інкубуйте лунки на орбітальному шейкері при **600-800 об/хв** протягом **30 хвилин** при кімнатній температурі.
  - Використовуючи автоматичний вошер, промийте **5 разів** промивальним буфером (**350 мкл/лунку**).
  - Додайте **100 мкл** хромогенного розчину ТМБ в кожну лунку, використовуючи напівавтоматичний диспенсер. Уникайте потрапляння прямих сонячних променів.
  - Інкубуйте при кімнатній температурі протягом **8-12 хвилин** на орбітальному шейкері при **600-800 об/хв**.
- Зауваження:** *Будь ласка, контролюйте візуально розвиток забарвлення для оптимізації часу інкубації.*
- Додайте **100 мкл** стоп-реагенту в кожну 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-реагенту розчину.

**Зауваження:** *Необхідно при зчитуванні абсорбції програмувати нульовий стандарт як «Бланк».*

### РЕЗУЛЬТАТИ

**Зауваження:** *Результати, наведені в цій інструкції, були отримані за допомогою калібрувальної кривої, апроксимованої методом кубічного сплайна, проведеної через точки, відкладені на логарифмічних осях. Дані, отримані за допомогою інших методів, можуть трохи відрізнятися.*

- Оптимальні результати можуть бути отримані при температурі інкубації **23 ± 2 °C**.
- Розрахуйте середнє значення поглинання для кожного стандарту, контролю та зразка.
- Використовуючи логарифмічний папір, відзначте точки розрахованих значень середнього поглинання стандартів на вертикальну вісь Y, а відповідні концентрації AMH в нг/мл на горизонтальну вісь X. Для розрахунку рекомендується використовувати апроксимацію кубічного сплайна.
- Визначте концентрацію AMH в контролях і зразках із стандартної кривої, порівнюючи розраховані середні значення поглинання з відповідною концентрацією AMH.
- Всі зразки зі значеннями, більшими, ніж у самого високого стандарту, попередньо розвести 0 нг/мл калібратором А/Розріджувачем Зразків і проаналізувати повторно.
- Будь-які зразки зі значеннями нижче, ніж у самого низького стандарту, слід вважати такими ж.
- Помножте результати на фактор розведення, якщо це необхідно.

### ОБМЕЖЕННЯ

Реагенти, застосовувані в цьому наборі, оптимізовані для вимірювання рівня AMH в сироватці і літій гепариновій плазмі. Не використовуйте для аналізу реагенти, що мають ознаки мікробної контамінації або містять осад. Гетерофільні антитіла, присутні в зразку, можуть заважати виконанню аналізу.

### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Кожна лабораторія повинна встановлювати свої власні діапазони нормальних значень.
- Контролі AMH/MIS ELISA або інші комерційні контролю повинні укладатися у встановлені довірчі інтервали.
- Довірчі інтервали для контролів AMH/MIS надруковані на калібрувальній карті.
- Калібрувальна крива, контролю низького і високого рівнів повинні бути включені в кожен аналіз.
- Розчин ТМБ має бути безбарвним. Розвиток блакитного забарвлення може свідчити про забруднення або нестабільність реагенту.

### ПРИКЛАД СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ

Номер лунки	Вміст лунки	Середнє, ОЦ	Конц., нг/мл
	Калібратори		
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

**Попередження:** *вищенаведені дані не повинні бути використані замість даних, отриманих в лабораторії.*

### АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

#### Межа кількісного визначення:

Мінімальна кількість AMH/MIS, 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 з концентрацією AMH/MIS в діапазоні 0.03-0.346 нг/мл згідно з рекомендаціями CLSI EP17. Протягом 2 днів було проведено 12 досліджень зразків сироватки в дублях.

#### Межа якісного визначення:

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 EP17. Протягом 2 днів було проведено 12 досліджень зразків сироватки в дублях (n = 24).

### Відтворюваність:

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 EP5-A і представлені в наступній таблиці:

Зразок	Значення	Усередині серії	Між серіями	Загальне
	(нг/мл)	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 розведення:

Згідно з рекомендаціями NCCLS EP-6-P були проаналізовані 3 зразка сироватки, що містять різну кількість АМН/МІС, розведені Калібратором А/розчинником 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%
	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%

### Відновлення:

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

Зразок	Доданий АМН/МІС (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:

Дана пара моноклональних антитіл, використана в аналізі, виявляє людський АМН/МІС.

Крос-реактант	Концентрація (нг/мл)	% крос-реактивності
Інгібін А	100	--
Інгібін В	100	--
Активін А	50	--
Активін В	50	--
Активін АВ	50	--
гАМН	130	--
Mature АМН	120	1.33
hАМН (Pro)	300	0.23
ProMature hАМН	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/МІС складала  $\pm 10\%$  від контрольної. Дослідження проведено згідно з рекомендаціями NCCLS EP7-P.

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

### Очікувані значення:

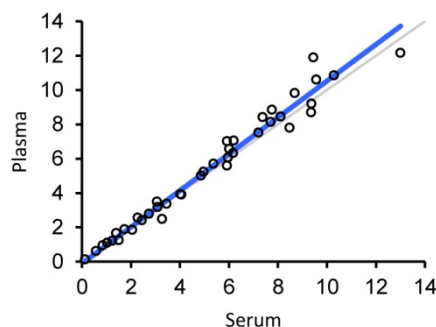
Діапазон очікуваних значень був отриманий з використанням 90-95% непараметричного розрахунку за допомогою Analyse-It для Microsoft Excel. Таблицю див. в оригіналі інструкції.

**Увага:** кожній лабораторії рекомендується встановлювати свій власний діапазон нормальних значень. Результати дослідження повинні враховуватися разом з клінічними даними.

### Тип зразка:

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

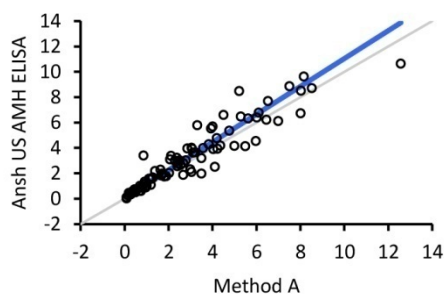
Плазма = 1.06 (сироватка) - 0.10 (r = 0.995; P < 0.0001)



### 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 Passing Bablok.

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



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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)