

PATHOZYME® FOLLICLE STIMULATING HORMONE [Ref] OD337

Immunoenzymatyczny test do ilościowego

oznaczania FSH w ludzkiej surowicy.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.

Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Hormon folikulotropowy (FSH) i hormon luteinizujący (LH) należą do czynników biorących udział w kontroli wzrostu i aktywności reprodukcyjnej gonad i są odpowiedzialne za syntezę i sekrecję żeńskich i męskich hormonów płciowych. Poziom krążący FSH i LH jest kontrolowany przez hormony płciowe poprzez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego.

FSH jest glikoproteiną wydzielaną z przedniego płata przysadki. Hormon uwalniająca gonadotropiny (GnRH), produkowany przez podwzgórze, kontroluje uwalnianie FSH z przedniego płata przysadki. Jak inne glikoproteiny, takie jak LH, TSH, hCG, FSH zbudowane jest z pojedynczości alfa i beta. Budowa pojedynczości alfa jest u wszystkich glikoprotein taka sama. Właściwości biologiczne i immunologiczne zależą od indywidualnej budowy pojedynczości beta. U kobiet, FSH stymuluje wzrost i dojrzewanie pęcherzyka jajnika, poprzez bezpośrednie oddziaływanie na receptory zlokalizowane w komórkach ziarnistych pęcherzyka Graffa. Wzrasta steroidogeneza w jajnikach i pobudzana jest produkcja LH. Następnie wytworzone LH przyłącza się do komórek i pobudza steroidogenezę. Wzrost wewnątrzjajnikowego estradiolu objawia się jako przyspieszone dojrzewanie pęcherzyków. Efektem jest stymulacja wzrostu aktywności receptorowej na FSH i przyłączanie FSH do pęcherzyków. Dlatego FSH, LH i estradiol odpowiadają za podtrzymywanie dojrzewania jajników u kobiet.

Przed poziomem FSH obserwuje się po menopauzie, kastracji i w przedwczesnym wycięciu funkcji jajników. Poziom FSH może być unormowany poprzez podawanie estrogenów, efektem czego jest włączenie się mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego. Zaburzenia pomiędzy FSH i LH oraz FSH i estrogenami mogą wystąpić w jadłowstręcie psychicznym i w zespole policystycznych jajników. Są wyjątki, do których należą zaburzenia jajników zwykle występujące, kiedy stężenie FSH losowo przekracza wartość 40 mIU/ml.

FSH ma regulujący wpływ na wzrost przewodów nasiennych i utrzymanie spermatogenezy u mężczyzn. Chociaż, androgeny, inne niż estrogeny, nie wpływają na obniżenie poziomu FSH. Mechanizm sprzężenia zwrotnego dotyczy tylko LH surowicy. Procesem nie do końca zrozumiałym jest wzrost poziomu FSH u mężczyzn z azospermią i oligospermią. Nowotwory jąder zwykle obniżają stężenie FSH. Wysoki poziom zaobserwowano w pierwotnym zaburzeniu jąder i w zespole Klinefeltera. Wzrost stężenia FSH występuje również w przypadkach głodzenia, zaburzenia funkcji nerek, nadczynności tarczycy i marskości wątroby.

Nie stwierdzono reakcji krzyżowych (wynik negatywny) dla następujących parametrów: HCG (WHO 1st IRP 75/539) do poziomu 100,000 mIU/ml, TSH (WHO 2nd IRP (80/558) do poziomu 100mIU/ml, LH (WHO 1st IRP 68/40) do poziomu 500 mIU/ml, prolaktyny (WHO 1st IRP 75/504) do poziomu 500ng/ml i HGH (WHO 1st IRP 65/217) do poziomu 200ng/ml.

PRZEZNACZENIE

PATHOZYME FSH jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania hormonu FSH w ludzkiej surowicy.

Do użytku w laboratorium.

ZASADA TESTU

Kubeczki mikroplastyki opłaszczane są monoklonalnymi, oczyszczonymi przeciwciałami anti-FSH. Do testu należy użyć surowicy. Następnie dodawane są inne, monoklonalne przeciwciała anti-FSH znakowane peroksydazą chrzanową (koniuat enzymatyczny). FSH obecne w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniuat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniuatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniuat enzymatyczny, wskazujący na obecność FSH w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Stężenie FSH jest proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia. Test został wykwalifikowany względem standardu WHO, 2nd IRP, 78/549.

SKŁAD ZESTAWU

[Ref]
OD337



Microtitre Plate

12 x 8 wells x 1

Dzielona mikroplastyka z kubeczkami o płaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torebce ze środkami pochłaniającymi wilgoć.

Cal	A	0 mIU/ml	1	
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona FSH. Liofilizat.				
Cal	B	5 mIU/ml	1	
Standard referencyjny: FSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat.				
Cal	C	15 mIU/ml	1	
Standard referencyjny: FSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat.				
Cal	D	50 mIU/ml	1	
Standard referencyjny: FSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat.				
Cal	E	100 mIU/ml	1	
Standard referencyjny: FSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat.				
Cal	F	200 mIU/ml	1	
Standard referencyjny: FSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat.				
Conj			11ml	
Anty-FSH HRP koniuat: koniuat anty-FSH znakowany HRP. Gotowy do użycia. (Różowy)				
Subs	TMB		11ml	
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametyllobendydyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Soln	Stop	HCl	1M	11ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Instrukcja i druk protokołu.				1 + 1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.
Kroćcówki do pipet.
Papier absorbacyjny.
Czytnik mikroplastyk z filtrem 450 nm.
Papier milimetry.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME FSH zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME FSH nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME FSH zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu słućkać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME FSH zawierają 1% Proclin™ 300 jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu słućkać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. -20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azjduku sodowego jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

Standardy: do każdej fiolki dodać po 1 ml wody destylowanej w celu rozpuszczenia liofilizatów. Odstawić na przynajmniej 20 minut przed użyciem. Rozpuszczone standardy są trwałe przez 30 dni jeśli są przechowywane w temp. 2°C - 8°C. W celu dłuższego przechowywania szczelnie zamknięte standardy zamrozić w temp. -20°C. Przed użyciem rozmrożone standardy muszą być delikatnie wymieszane.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnoza nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu.
6. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
7. Inkubować 45 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbcyjnym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odczyszczenia.
9. Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbcyjnym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbcyjnym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
11. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odczyszczenia. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbcyjnym lub papierowym ręczniku.
12. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
13. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
14. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
15. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
16. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyki przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowicy używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub oplaszczonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odtwarzalności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{550}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na oś X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach mIU/ml, a na oś Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości FSH dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5. W oparciu o określoną ilość losowo wybranych próbek badanych pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecniecznie otwartym, średnie stężenie FSH dla mężczyzn (N=100) i kobiet (N=150) wynosi odpowiednio 11 i 12 mIU/ml.

Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME FSH** stężenie całkowitego FSH wynosi 1,5 mIU/ml.

Nie stwierdzono wpływu innych czynników na wynik oznaczenia wykonanego powyższym testem do poziomu 1,500 mIU/ml.

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME FSH** jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega **PATHOZYME FSH** kit i SeroSerozyme FSH kit użyciu próbek o wartościach FSH pomiędzy 0,1 a 143 mIU/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	136
Współczynnik korelacji	0.99
Wartość nachylenia krzywej	1.05
Punkt przecięcia z osią OY	0.55
Wartość średnia testem Omega	18.8 mIU/ml
Wartość średnia testem Sero	18.4 mIU/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

- (1) Marshall, J. C. Clin. Endocrinol. Metab. 1975;4:545.
- (2) Cohen, K. L. Metabolism. 1977;26:1165.
- (3) Rebar, R. W., Erickson, G. F. and Yen, S. S. C. Fertil. Steril. 1982;37:35.
- (4) Abraham, G. E. (ed.). Radioassay Systems in the Clinic. Endocrinol. Marcel Dekker Inc., New York: 1981.
- (5) Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E. J. Immunol. Methods. 1981;42:11.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych, a następnie do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu anty-FSH. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
2. Inkubować 45 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
3. Wylać zawartość z kubeczków i przemycić 5-krotnie wodą destylowaną.
4. Do każdego kubeczka dodać po 100µl substratu. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
5. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
6. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
7. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8083 ISSUE 4 Revised July 2010

© Omega Diagnostics Ltd. 2010. POLISH.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY

