

PATHOZYME® FOLLICLE STIMULATING HORMONE Ref OD337

Test ImunoEnzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă

a FSH în serul uman.

Depozitați la 2°C - 8°C. Nu Congelați.

Doar pentru utilizare in-vitro.

INTRODUCERE

Hormonul stimulant al foliculilor ovarieni (FSH) și hormonul luteinizant (LH) sunt întim implicați în controlul creșterii și activității reproductive a țesuturilor gonadale, care sintetizează și secretă hormonii sexuali feminini și masculini. Nivelurile FSH și LH circulante sunt controlate de hormonii sexuali printr-un mecanism de feedback negativ.

FSH este o glicoproteină secretată de hipofiza anterioară. Hormonul de eliberare a gonadotropinei (GnRH), produs în hipotalamus, controlează eliberarea de FSH din hipofiza anterioară. Ca și alte glicoproteine precum LH, hormonul stimulant tiroidian (TSH) și Gonadotropina corionică umană (hCG), FSH este alcătuit din subunități alpha și beta. Deoarece subunitățile alpha sunt similare din punct de vedere structural, proprietățile biologice și imunologice ale fiecăruia sunt dependente de subunitatea beta unică.

La femei, FSH stimulează creșterea și maturarea foliculilor ovarieni acționând direct asupra receptorilor localizați în celulele granulare; steroidogeneza foliculară este promovată iar producerea de LH este stimulată. LH produs se leagă apoi de aceste celule și stimulează steroidogeneza. Producerea crescută de estradiol intraovarian are loc pe măsură ce maturarea foliculară progresează, la rândul său, iar stimularea activității crescute a receptorului FSH și a legării foliculare a FSH. FSH, LH și estradiolul cooperează în maturarea ovariană la femei.

Nivelurile FSH sunt crescute după menopauză, castrare și insuficiență prematură ovariană. Nivelurile de FSH pot fi normalizate prin administrare de estrogen, demonstrând astfel un mecanism de feedback negativ. Legături anormale între FSH și LH și FSH și estrogen au fost legate de anorexia nervoasă și boala polichistică ovariană.

Cu toate că sunt și excepții, insuficiența ovariană este indicată de concentrațiile de FSH ce depășesc 40 mIU/ml.

FSH controlează creșterea tubilor seminiferi și menține spermatogeneza la bărbați. Cu toate acestea, androgenii, spre deosebire de estrogen, nu scad nivelurile de FSH, demonstrând o legătură de feedback doar cu LH seric.

Din cauza unor motive ce nu sunt înțelese pe deplin, bărbații azospermici și oligospermici au niveluri crescute de FSH. Tumorile testiculare scad de obicei concentrația de FSH seric. Nivelurile crescute de FSH la bărbați pot fi găsite în insuficiența testiculară primară și în sindromul Klinefelter. Concentrațiile crescute sunt de asemenea prezente în cazurile de infometare, insuficiență renală, hipotiroidism și ciroză.

Următoarele preparate au fost testate ca negative: HCG (Primul Preparat de Referință Internațional al OMS 75/539) la 100.000 mIU/ml, TSH (Al doilea Preparat de Referință Internațional al OMS 80/558) la 100 mIU/ml, LH (Primul Preparat de Referință Internațional 68/40) la 500 mIU/ml, Prolactină (Primul Preparat de Referință Internațional al OMS 75/504) la 500 ng/ml și GHG (Primul Preparat Internațional al OMS 65/217) la 200ng/ml.

UTILIZARE

PATHOZYME FSH este un test ImunoEnzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a hormonului stimulator al foliculilor ovarieni (FSH) în serul uman. A fi folosit doar de personalul medical.

PRINCIPIUL TESTULUI

Anticorpii monoclonali, anti-FSH sunt pregătiți, purificați și fixați în godeurile de microtitrare. Se aplică serul de testat. Apoi se adaugă un alt anticorp monoclonal anti-FSH marcat cu peroxidază din hrean. Dacă în probă este prezent FSH uman, se va combina cu anticorpii fixați de godeu și conjugatul enzimatic, dînd naștere unor "sandwich-uri" de molecule FSH fîncate de anticorpii de fază solidă și de cei legați de enzimă. După incubare, godeurile sunt spălate cu apă pentru a îndepărta anticorpii marcați nelegați.

După adăugarea substratului (TMB) se vor colora doar acele godeuri în care enzima este prezentă, indicînd prezența FSH. Reacția este oprită de adăugarea de Acid Clorhidric diluat, după care absorbanta este măsurată la 450nm. Concentrația de FSH este direct proporțională cu intensitatea culorii din proba testată. Acest test a fost calibrat cu cel de-al doilea Preparat de Referință Internațional la OMS, 78/549.

CONȚINUT

Ref
OD337



Microtitre Plate	12 x 8 godeuri x 1		
Godeuri detașabile "căpșușite" cu anticorpi specifici conținuți într-o pungă de folie ce conține un desicant.			
Cal A	0 mIU/ml	1	
Standard de Referință: Ser uman fără FSH. Liofilizat.			
Cal B	5 mIU/ml	1	
Standard de Referință: FSH diluat în ser uman. Liofilizat.			
Cal C	15 mIU/ml	1	
Standard de Referință: FSH diluat în ser uman. Liofilizat.			
Cal D	50 mIU/ml	1	
Standard de Referință: FSH diluat în ser uman. Liofilizat.			
Cal E	100mIU/ml	1	
Standard de Referință: FSH diluat în ser uman. Liofilizat.			
Cal F	200mIU/ml	1	
Standard de Referință: FSH diluat în ser uman. Liofilizat.			
Conj		11 ml	
Conjugat Anti-FSH HRP: Anticorpi Anti-FSH conjugați de HRP. Gata de lucru (Roz)			
Subs	TMB	11ml	
Soluție Substrat: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidină în tampon citrat. Gata de lucru. (incolor)			
Soln	Stop HCl	1M	11ml
Soluție de Stopare: Acid clorhidric diluat în apă purificată. Gata de lucru. (Incolor).			
Instruction leaflet and EIA Data Recording Sheet			1 + 1

MATERIALE NECESARE DAR CARE NU SUNT PREZENTE ÎN KIT

Micropipete: 100µl, 200µl și 1000µl
Virfuri de pipetă de unică folosință
Hîrtie absorbantă
Cititor de microplăci cu filtru de 450nm
Hîrtie milimetrică
Sclăriere de laborator foarte curată.

PRECAUȚIUNI

PATHOZYME FSH conține materiale de origine umană care au fost testate și confirmate negative prin proceduri aprobate de FDA pentru anticorpi HCV, HIV 1 și 2 și pentru HbsAg, la nivel de donator unic. Deoarece nici un test nu poate oferi o garanție completă că produsele derivate din surse umane nu vor transmite agenți infecțioși, se recomandă ca reacții din acest kit să fie manipulați cu grijă și atenția corespunzătoare atît în timpul utilizării cit și cînd sunt deșeurii. Nu ingerați.

Reactivii **PATHOZYME FSH** nu conțin substanțe periculoase așa cum sunt definite de legislația Chimică a Marii Britanii (Informații și Ambalare substanțe periculoase pentru Furnizare). Toți reactivii trebuie totuși tratați ca substanțe cu potențial risc biologic atît cînd sunt folosite cit și cînd sunt deșeurii. Rezolvarea finală a deșeurilor trebuie făcută în conformitate cu legislația locală.

Soluția de Stopare **PATHOZYME FSH** este acid clorhidric diluat și este deci corozivă. Manipulați cu grijă. În caz de contact cu tegumentul, spălați cu grijă cu apă.

Reactivii **PATHOZYME FSH** conțin Proclin™ 300* în concentrație de 1% ca și conservant. Este toxică atunci cînd este ingerată. În caz de contact, spălați bine cu apă de la robinet și consultați un medic. * Proclin™ 300 este o marcă înregistrată a ROHM & HAAS Limited.

DEPOZITARE

Reactivii trebuie depozitați la temperaturi de 2°C - 8°C.

Data expirării este ultima zi a lunii menționate pe eticheta recipientului și pe ambalajul kit-ului. Performanța kit-ului va fi cea specificată pînă la data expirării menționată așa cum este determinată de la data producerii și după cum este menționat pe kit și componentele acestuia. Nu folosiți reactivii după data expirării.

Evitați expunerea reactivilor la temperatură excesivă. Nu expuneți reactivii la lumina directă a soarelui.

NU CONGELAȚI NICI UN REACTIV (cu excepția depozitării standardelor) deoarece acesta va fi iremediabil alterat.

RECOLTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBEI

Recoltați o probă de sînge venos de la pacient și lăsați să se formeze și retractive cheagul. Centrifugați proba de sînge coagulat și colectați serul limpede. Este nevoie de ser proaspăt.

Nu folosiți pentru testare ser hemolizat, contaminat sau lipemic deoarece aceasta va influența nedoriți rezultatele.

Serul poate fi depozitat la 2°C - 8°C timp de 48 de ore înainte de testare. Dacă este nevoie de depozitare pe durată mai lungă, puteți păstra serul la -20°C pe o durată de 1 an. Probele decongelate trebuie amestecate bine înainte de a fi utilizate.

Nu folosiți ca și conservant Azida sodică deoarece aceasta va inhiba sistemul enzimatic Peroxidază.

Nu congelați-decongelați în mod repetat probele - veți obține rezultate false.

PREGĂTIREA REACTIVILOR

Toți reactivii trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei (20°C-25°C) și amestecați ușor pentru a resuspenda latex-ul înainte de utilizare. Evitați formarea spumei.

Adăugați 1ml de apă distilată în fiecare flacon de standad pentru a reconstitui standardele liofilizate. Lăsați în repaus cel puțin 20 de minute și apoi amestecați ușor. Standardele reconstituite vor fi stabile timp de 30 de zile dacă sunt depozitate la 2°C - 8°C. Pentru o depozitare mai îndelungată păstrați sigilat la - 20°C atunci cînd nu folosiți. Standardele dezghețate trebuie amestecate înainte de testare.

LIMITELE UTILIZĂRII

Folosirea altor tipuri de probe, altele decît serul nu a fost validată pentru acest test. Nu există protocol de reutilizare pentru acest produs.

Atunci cînd faceți interpretarea testului este recomandat să luați în considerare toate datele clinice. Diagnosticul nu trebuie să fie stabilit doar pe baza rezultatelor unui singur test clinic.

PROCEDURA DE TESTARE

1. Aduceți toate componentele kit-ului și serul de testat la temperatura camerei (20°C-25°C) înainte de a începe testarea.
2. Se recomandă rularea unui set de standarde la fiecare procesare de probe. Fixați numărul dorit de godeuri în stativ. Înregistrați poziția standardelor și a serului de testat pe Fișa de Înregistrare a Datelor EIA.
3. Stripurile nefolosite trebuie resigilate în punga de folie conținând desiccant și plasate apoi la 2°C - 8°C.
4. Pipetați 50μl de Standarde și de ser de testat în godeurile stabilite.
5. Pipetați 100μl de Conjugat Anti-FSH în fiecare godeu.
6. Amestecați viguros timp de 30 de secunde. Este foarte important să amestecați complet.
7. Incubați placa timp de 45 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
8. La sfârșitul perioadei de incubare, aruncați conținutul godeurilor răsturnând brusc conținutul plăcii cu partea superioară în jos deasupra unui container de deșeurii cu risc biologic și apoi loviți placa (cu partea superioară în jos) pe o bucată de hirtie absorbantă. Aveți grijă ca în recipientul pentru deșeurii să se afle un dezinfectant corespunzător.
9. Spălare Manuală. Umpleți godeurile cu minimum 300μl de apă distilată pentru fiecare godeu. Întoarceți brusc placa deasupra recipientului de deșeurii biologice. Loviți placa de hirtie absorbantă.
10. Loviți din nou placa (cu partea superioară în jos) de o bucată de hirtie absorbantă pentru a îndepărta toate picăturile de apă reziduală.
11. Spălare Automată: controlați ca 300μl de apă distilată să fie pipetați în fiecare godeu și ca în recipientul cu deșeurii să fie adăugat un dezinfectant potrivit. Spălați godeurile de 5 ori. După ce spălați, îndepărtați excesul de lichid lovind placa inversată de o hirtie absorbantă.
12. Pipetați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 5 secunde.
13. Incubați la întuneric timp de 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
14. Opriti reacția adăugând 100μl de Soluție de Stopare în fiecare godeu.
15. Amestecați ușor timp de 30 de secunde pentru a asigura virarea completă a culorii albastre în galben.
16. Citiți imediat densitatea optică (pină în 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

EVITAREA ERORILOR

Poate fi folosit de personalul cu minimă pregătire bazică de laborator.

Nu folosiți componente ale kit-ului care sunt deteriorate sau contaminate.

Folosiți un vîrf de pipetă de unică folosință pentru fiecare probă pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Deși nu este necesară se recomandă rularea probelor și standardelor în duplicat.

Probele și standardele trebuie rulate simultan pentru a avea condiții de testare similare.

Se recomandă să nu folosiți mai mult de 32 de godeuri odată atunci cînd pipetați manual, deoarece pipetarea Standardelor și probelor trebuie să fie completă în decurs de 3 minute. Se poate folosi o placă completă de 96 de godeuri doar dacă este disponibilă pipetarea automată.

Puneți la loc capacul pe recipientele cu reactivi imediat după utilizare.

Evitați pipetarea repetată din reactivii de stoc, deoarece se poate produce contaminare.

Nu amestecați reactivii sau stripurile provenind de la kit-uri diferite. Atunci cînd pipetați aveți grijă să nu atingeți suprafața godeului. Nu pipetați reactivul pe partea laterală a godeului. Înainte de începutul testării, lăsați reactivii să ajungă la temperatura camerei (20° - 25°C). Amestecați ușor toți reactivii cu mișcări blinde de rotație.

Odată testarea pornită, godeurile nu trebuie să se usuce în cursul derulării testului.

Nu contaminați Soluția Substrat deoarece kit-ul va deveni nefuncțional.

Controlați precizia și acuratețea echipamentului de laborator folosit în timpul procedurii pentru a asigura rezultate reproductibile.

Strip-urile nefolosite ar trebui resigilate în punga de folie care conține desiccant și apoi depozitate la 2°C - 8°C.

CALCULAREA REZULTATELOR

Calculați valoarea absorbanței medii (A_{450}) pentru fiecare set de standarde și probe. Creați o curbă standard făcînd un grafic cu absorbanta medie pentru fiecare Standard în funcție de concentrația în mU/ml pe hirtie milimetrică, cu valorile absorbanței pe axa Y și concentrațiile pe axa X.

Folosiți valorile absorbantei medii pentru fiecare probă pentru a determina concentrația corespunzătoare de FSH în mU/ml din curba standard.

Dacă nivelurile controalelor sau ale probelor cu valori cunoscute nu dau rezultatele scontate, rezultatele testului trebuie considerate invalide.

Dacă folosiți un pachet software alegeți o curbă de regresie quadratică care să se potrivească.

VALORI PREDICȚIONATE ȘI SENSIBILITATE

Graficul produs de calibratori trebuie să aibă o formă hiperbolică cu densitatea optică (DO) citită la 450 nm proporțională cu concentrația lor. DO a calibratorului A trebuie să fie mai mică de 0,75 iar DO a calibratorului F mai mare de 1,5 pentru ca rezultatele testului să fie valide.

Folosind probe selectate aleator, valorile medii ale FSH la bărbați (n=100) și femei (n=150) sunt respectiv de 11 mU/ml și 12 mU/ml.
Valorile medii ale FSH la femeile postmenopauză (n=60) și gravide (n=60) sunt de respectiv 94 și 1,0 mU/ml. Concentrația minim detectabilă de **PATHOZYME FSH** este estimată a fi de 1,5 mU/ml. Nu s-a observat efect de prozonă (Hook) pentru acest test la niveluri de pină la 1.500 mU/ml.

DATE DE EVALUARE

Calibrat cu competitori importanți și cu standarde interne.
Coeficientul de variație al **PATHOZYME FSH** este mai mic sau egal cu 10%.

Într-o evaluare dintre kit-ul Omega Pathozyme FSH și kit-ul Serozyme FSH produs de Serono, pentru probe cuprinse între 0,1 și 143 mU/ml, au fost generate următoarele date.

Număr de probe	136
Coeficient de corelare	0,99
Pantă	1,05
Intercept	0,55
Medie Omega	18,8 mU/ml
Medie Serono	18,4 mU/ml

S-a dovedit că aceste kit-uri au o bună corelare.

BIBLIOGRAFIE

- (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., Ruoslahi, E. and Engvall, E. *J. Immunol. Methods.* 1981;42:11.

GHID RAPID AL PROCEDURII DE TESTARE

1. Pipetați 50μl de Standard sau probe și 100μl de Conjugat anti-FSH în fiecare godeu și apoi amestecați bine timp de 30 de secunde.
2. Incubați timp de 45 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
3. Aruncați conținutul godeurilor și spălați de cinci ori cu apă distilată.
4. Adăugați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați bine timp de 5 secunde.
5. Incubați la întuneric timp de 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
6. Adăugați 100μl de Soluție de Stopare în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 30 de secunde.
7. Citiți imediat (nu mai târziu de 10 minute) densitatea optică folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

8083 ISSUE 4 Revised April 2003 ROMANIAN

© Omega Diagnostics Ltd. 2003



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001:2000 CERTIFIED COMPANY