



INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

TABLE OF CONTENTS

English	2	Čeština (CZ)	54
Français (FR)	7	Türkçe (TR)	59
Deutsch (DE)	13	Русский (RU)	64
Italiano (IT)	19	Română (RO)	70
Español (ES)	25	Србија (SR)	75
Português Portugal (PT-PT)	31	APPENDIX	80
Dansk (DA)	37	REFERENCES	84
Ελληνικά (EL)	42		
Magyar (HU)	48		

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial
CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil
CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telephone: 0800-771-8818

ООО «Бекмен Култер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH s.r.o., Radiova 1, 102 27 Prague 10, Czech Republic

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

FOR PROFESSIONAL USE ONLY,

The Inhibin A enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit provides materials for the quantitative measurement of dimeric inhibin A in human serum or plasma. It is intended strictly for *in vitro* use as an aid in the diagnosis and monitoring of various hormonal reproductive disorders. Down syndrome (Trisomy 21) screening in the 2nd trimester using combined biochemical and ultrasound markers may be assessed with appropriate algorithms that can be run on commercially available risk calculation software.^{24, 25} It is strongly recommended to use validated (CE marked) software designated specifically for evaluating the risk of Trisomy 21, e.g. software alpha.* The Inhibin A kit is intended for use in combination with hAFP + hCG + uE3.

SUMMARY

Inhibins are heterodimeric protein hormones secreted by granulosa cells of the ovary in the female and Sertoli cells of the testis in the male. They selectively suppress the secretion of pituitary follicle stimulating hormone (FSH) and also have local paracrine actions in the gonads.^{1,2}

The fully processed form of the inhibin molecule has a molecular weight of approximately 32 kD and consists of the two distinct chains (α and β), linked by disulfide bridges. Higher molecular weight forms, with precursor forms of the α -subunit, also occur in follicular fluid and serum. In addition, free α -subunit forms, unassociated with a β -subunit, and lacking inhibin bioactivity, are also present.^{3,4,5,6}

Inhibin A consists of an α -subunit and a β_A -subunit. Measurements of inhibin A are shown to be useful in studying its role in the human reproductive physiology.^{7,8,9} Several published reports indicate the utility of inhibin A measurement as an endocrine marker for monitoring ovarian function.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Until recently, it was not possible to distinguish between circulating functional dimeric inhibin and free α -subunit in the normal human menstrual cycle.

However, by using the highly characterized pair of antibodies, the two-site sandwich ELISA is found to be able to specifically measure only the dimeric inhibin A.¹⁸

PRINCIPLE

The Inhibin A ELISA is an enzymatically amplified two-step "sandwich" assay. In the assay, calibrators, controls and samples are incubated in microtitration wells which have been coated with anti-inhibin β_A subunit antibody. After incubation and washing, anti-inhibin alpha subunit detection antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP) is added to each well. After a second incubation and washing step, the substrate tetramethylbenzidine (TMB) is added to the wells.

Lastly, an acidic stopping solution is added. The degree of enzymatic turnover of the substrate is determined by dual wavelength absorbance measurement at 450 nm and between 600 and 630 nm. The absorbance measured is directly proportional to the concentration of inhibin A in the samples. A set of Inhibin A calibrators is used to plot a standard curve of absorbance versus inhibin A concentration. The inhibin A concentrations in the samples can then be calculated from this standard curve.

WARNING AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use.

Use good laboratory practices.¹⁹

Samples and blood-derived products may be routinely processed with minimum risk using the procedure described. However, handle these products as potentially infectious according to universal precautions and good clinical laboratory practices, regardless of their origin, treatment or prior certification.²⁰ Use an appropriate disinfectant for decontamination. Store and dispose of these materials and their containers in accordance with local regulations and guidelines.

GHS HAZARD CLASSIFICATION

Calibrators / Controls WARNING



H317	May cause an allergic skin reaction.
H412	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P273	Avoid release to the environment.
P280	Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before use. reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) <0.05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate

WARNING



H316	Causes mild skin irritation.
H317	May cause an allergic skin reaction.
H412	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P273	Avoid release to the environment.
P280	Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P332+P313	If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before use. 3-(N-Morpholino)-2-hydroxy Propane Sulfonic Acid, Sodium Salt 1 - 2% reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) <0.05%

Sample Buffer A

DANGER



H316	Causes mild skin irritation.
H318	Causes serious eye damage.
P280	Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P310	Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
P332+P313	If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. Sodium Lauryl Sulfate 1 - < 3% Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 1 - 2%

Each laboratory should determine the acceptability of its own blood collection tubes and serum separation products. Variations in these products may exist between manufacturers and, at times, from lot-to-lot.

Avoid repeated freezing and thawing of samples.

Avoid assaying lipemic, icteric or hemolyzed samples.

MATERIALS PROVIDED

Kit for the determination of Inhibin A: 96 wells (Cat. #DSL-10-28100T-1)

Anti-Inhibin A Antibody Coated Microtitration strips: One strip holder, containing 96 microtitration wells

Polystyrene microtitration wells with anti-inhibin β_A immobilized to the inside wall of each well.

Store at 2 to 8°C until expiration date in the resealable pouch with a desiccant to protect from moisture.

Inhibin A Antibody-Enzyme Conjugate Concentrate: One 0.6 mL vial

Mouse monoclonal anti-inhibin α -subunit antibody-HRP conjugate, MOPSO, BSA and < 1.0% ProClin** 300.

Store at 2 to 8°C until expiration date.

Dilute prior to use in Conjugate Diluent.

Calibrators: Six 1 mL vials and one 2 mL vial of “zero” calibrator (ready-to-use)

Concentrations of approximately 0, 10, 30, 100, 250, 500 and 1000 pg/mL recombinant dimeric inhibin A in bovine serum with < 0.5% ProClin 300.

Refer to vial labels for exact concentrations.

Store unopened at 2 to 8°C until the expiration date.

Stable at 2 to 8°C for 28 days after initial use. For longer periods store in a -20°C freezer (-15°C to -24°C) until expiration date.

The measurand (analyte) in the Inhibin A calibrators is traceable to the World Health Organization First International Standard for Inhibin-A (code 91/624) containing recombinant 32 kDa human inhibin A (1 pg/mL or 0.037 IU/mL). The assigned values were established using representative samples from this lot of standard and are specific to the assay methodologies of the reagents. Values assigned by other methodologies may be different. Such differences, if present, may be caused by inter-method bias.

Controls: Two 1.0 mL vials (ready-to-use)

Low and high concentrations of recombinant dimeric inhibin A in bovine serum with < 0.5% ProClin 300.

The expected values are in the concentration range indicated on a supplement.

Store unopened at 2 to 8°C until the expiration date.

Stable at 2 to 8°C for 28 days after initial use. For longer periods store in a -20°C freezer (-15°C to -24°C) until expiration date.

Sample Buffer A: One 10.0 mL bottle

Buffer with bovine serum albumin (BSA), animal serum (goat, mouse), surfactant, and sodium azide.

Store at 2 to 8°C until expiration date.

Sample Buffer B: One 10.0 mL bottle

Buffer with < 20% urea hydrogen peroxide, < 0.5% ProClin 300, and sodium azide.

Store at 2 to 8°C until expiration date.

TMB Chromogen Solution: One 11.0 mL bottle

Tetramethylbenzidine (TMB) in citrate buffer with hydrogen peroxide.

Store at 2 to 8°C until expiration date.

Stopping Solution A: One 11.0 mL bottle

0.2 M sulfuric acid.

Store at 2 to 8°C or room temperature (18-25°C) until expiration date.

Conjugate Diluent: One 15.0 mL bottle

Buffer with BSA, animal serum (goat, mouse), surfactant, and < 1.0% ProClin 300.

Store at 2 to 8°C until expiration date.

Wash solution U (20X): One 50 mL vial

Concentrated solution has to be diluted before use.

Store at 2 to 8°C or room temperature (18-25°C) until expiration date.

Kit for the determination of Inhibin A: 384 wells (Cat. #DSL-10-28100T-4)

Anti-Inhibin A Antibody Coated Microtitration strips: Four strip holders, each containing 96 microtitration wells.

Inhibin A Antibody-Enzyme Conjugate Concentrate: Four 0.6 mL vials

Calibrators: Twelve 1 mL vials and two 2 mL vials of “zero” calibrator (ready-to-use)

Controls: Four 1.0 mL vials (ready-to-use)

Sample Buffer A: Four 10.0 mL bottles

Sample Buffer B: Three 10.0 mL bottles

TMB Chromogen Solution: One 50.0 mL bottle

Stopping Solution A: Four 11.0 mL bottles

Conjugate Diluent: Four 15.0 mL bottles

Wash solution (20X): two 50 mL vials

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

- Microtitration plate reader capable of absorbance measurement at 450 nm and preferentially capable of dual wavelength correction between 600 and 630 nm
- Deionized Water
- Precision pipette to deliver 50-100 μ L
- Microtitration plate shaker capable of 500–700 orbital revolutions per minute (rpm)
- Microtitration plate washer
- Vortex mixer
- Absorbent materials for blotting the strips
- Graph paper for manual data reduction

PROCEDURE

Procedural notes

- A thorough understanding of this package insert is necessary for successful use of the Inhibin A ELISA.
- It is the responsibility of the customer to validate the assay for their use.
- Reliable results will only be obtained by using precise laboratory techniques and accurately following the package insert.
- A standard curve must be included with each assay.
- Bring all kit reagents to room temperature (18-25°C) before use.
- Thoroughly mix the reagents before use by gentle inversion.
- Do not mix various lots of any kit component within an individual assay.
- Do not use any component beyond the expiration date shown on its label.
- Incomplete washing will adversely affect the outcome and assay precision.
- To minimize potential assay drift due to variation in the substrate incubation time, care should be taken to add the stopping solution into the wells in the same order and speed used to add the TMB chromogen solution.
- Handle all reagents carefully to avoid introducing microbial contaminants which can damage the reagents, especially the Conjugate Diluent and Sample Buffer A.
- Avoid contamination of the TMB chromogen solution with the conjugates.
- Use a clean disposable pipette tip for each reagent, calibrator, control or sample.
- For dispensing sulfuric acid and TMB chromogen solution, avoid pipettes with metal parts.
- The enzyme used as the label is inactivated by oxygen, and is highly sensitive to microbial contamination, sodium azide, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies.

- Use deionized water.
- Avoid exposure of the reagents to excessive heat or direct sunlight during storage and incubation.

Preparation of reagents

1. **Wash Solution:** Pour the contents of the vial into 950 mL of distilled water and homogenize. The diluted solution can be stored at 18-25°C one month or at 2-8°C until the expiry date of the kit.
2. **Inhibin A Antibody-Enzyme Conjugate Solution:** The Inhibin A Antibody-Enzyme Conjugate Concentrate should be diluted at a ratio of 1 part into 50 parts of the Inhibin A conjugate diluent, according to the number of wells used. For an entire plate, pipet exactly 220 µL of the Inhibin A antibody-enzyme conjugate concentrate into 11 mL of the conjugate diluent.
NOTE: The Inhibin A antibody-enzyme conjugate concentrate should be freshly diluted 10–15 minutes prior to use.
3. **Microtitration Wells:** Select the number of coated wells required for the assay. The remaining unused wells should be placed in the resealable pouch with a desiccant. The pouch must be resealed to protect from moisture.

Assay procedure

Allow all samples and reagents to reach room temperature (18-25°C). Mix reagents thoroughly by gentle inversion before use. After reconstitution of reagents, mix thoroughly, avoiding foam. Calibrators, controls and samples should be assayed in duplicate.

1. Mark the microtitration strips to be used.
2. Pipet 50 µL of the calibrators, controls and samples to the appropriate wells.
3. Add 50 µL of the Sample Buffer A to each well using a precision pipette.
4. Add 50 µL of the Sample Buffer B to each well using a precision pipette.
5. Incubate the wells, shaking at 500–700 rpm on an orbital microplate shaker, for three hours at room temperature (18-25°C).
6. Prepare the antibody-enzyme conjugate solution by diluting the antibodyenzyme conjugate concentrate in the Inhibin A conjugate diluent as described under the “Preparation of Reagents” section of this package insert.
7. Aspirate and wash each well six times with the wash solution using an automatic microplate washer or manually using a precision pipette. Blot and dry by inverting plate on absorbent material.

NOTE: Use of an automatic microplate washer is strongly recommended. Incomplete washing will adversely affect assay precision. If a microplate washer is not available, follow these steps to wash the plate manually:

- (a) Completely aspirate the liquid from each well
 - (b) Dispense 350 µL of the wash solution into each well using a precision pipette
 - (c) Aspirate the liquid again
 - (d) Repeat steps (b) and (c) five times
8. Add 100 µL of the antibody-enzyme conjugate solution to each well using a precision pipette.
 9. Incubate the wells, shaking at 500–700 rpm on an orbital microplate shaker, for one hour at room temperature (18-25°C).
 10. Aspirate and wash each well six times with the wash solution using an automatic microplate washer. Blot dry by inverting plate on absorbent material.
 11. Add 100 µL of the TMB chromogen solution to each well using a precision pipette.

Avoid exposure to direct sunlight.

12. Incubate the wells, shaking at 500–700 rpm on an orbital microplate shaker, for 15 minutes at room temperature (18-25°C).

NOTE: Be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Visually monitor the color development to optimize the incubation time.

13. Add 100 µL of the stopping solution to each well using a precision pipette.
14. Read the absorbance of the solution in the wells within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm.

NOTE:

1) While reading the absorbance of the microtitration well, it is necessary to program the zero calibrator as a “Blank”.

2) If wavelength correction is available, set the instrument to dual wavelength measurement at 450 nm with background wavelength correction set between 600 and 630 nm.

RESULTS

1. Calculate the mean absorbance for each calibrator, control or sample.
2. Plot the log of the mean absorbance readings for each of the calibrators along the y-axis versus log of the inhibin A concentrations in pg/mL along the x-axis, using a linear curve-fit. Alternatively, the data can be plotted linear vs. linear and a smoothed spline curve-fit can be used.
3. Draw the best fitting curve through the mean of the duplicate points.
4. Determine the Inhibin A concentrations of the controls and samples from the standard curve by matching their mean absorbance readings with the corresponding Inhibin A concentrations.
5. Any sample reading higher than the highest calibrator should be appropriately diluted using Inhibin A Calibrator 0 and reassayed.
6. Any sample reading lower than the analytical sensitivity should be reported as such.
7. Multiply the value by a dilution factor, if required.

NOTE: If the absorbance readings exceed the limitations of the plate reader, a second reading at 405 nm is needed (reference filter between 600 and 630 nm if available). In this case, proceed to construct a second standard curve as above with the absorbance readings of all calibrators at 405 nm. The concentration of the off-scale samples at 450 nm is then read from the new standard curve. The readings at 405 nm should not replace the on-scale readings at 450 nm.

Standard curve

Calibrators	Conc. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0.00	0.022 (Blank)	-
1	9.20	0.028	1.021
2	24.3	0.082	2.991
3	90.0	0.305	11.11
4	214	0.733	26.75
5	415	1.302	47.48
6	833	2.741	100.0

(Example of standard curve, do not use for calculation).

Samples

To convert from IU/mL, use the following equation:

$$1 \text{ IU/mL (WHO 91/624)} = 26.7 \text{ pg/mL}$$

EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own reference ranges to assure proper representation of specific populations. The following values presented were obtained with the Inhibin A ELISA using serum samples from apparently normal healthy adults. All values are reported in pg/mL. For normally cycling females, numbers beneath each phase represent days before or after LH surge.

Population	n	Mean	Median	95% Confidence range
Normally Cycling Females				
Early Follicular Phase (-14 to -10)	136	13.48±0.93	10.54	†5.46-28.16
Mid Follicular (-9 to -4)	228	18.63±0.59	17.06	†7.87-34.54
Late Follicular (-3 to -1)	130	56.10±2.30	52.19	19.49-102.3
Mid Cycle (Day 0)	42	98.87±30.99	98.23	49.92-155.5
Early Luteal (1 to 3)	115	71.59±3.39	67.24	35.93-132.7
Mid Luteal (4 to 11)	268	75.22±2.63	72.51	13.15-159.6
Late Luteal (12 to 14)	82	27.87±3.20	17.44	†7.28-89.95
IVF Peak levels	43	792.4±70.63	705.91	354.2-1,690
PCOS - Ovulatory	26	†9.32±2.61		†5.65-15.99
Postmenopausal	23	†1.15±0.24		†<1-3.88
Normal Males	40	†1.33±0.42		†<1-3.58

† Inhibin A values below Calibrator 1 are extrapolated.

The values represented in the following table are maternal serum inhibin A in the second trimester.

Completed week	No. of samples	Median Inhibin A (pg/mL)	LOG ₁₀ SD
15	30	157.55	0.27
16	124	153.29	0.27
17	74	151.20	0.27
18	45	155.14	0.27
19	20	165.18	0.27
20	16	185.76	0.27

Table adapted from values provided by a US screening center (2005).

QUALITY CONTROL

- Inhibin A ELISA controls or other commercial controls should fall within established confidence limits.
- The confidence limits for Inhibin A ELISA controls are printed on the supplement.
- A full standard curve, plus low and high level controls, should be included in each assay.
- The TMB chromogen solution should be colorless to very light yellow. Development of a blue color may indicate reagent contamination or instability.
- Quality control materials simulate the characteristics of patient samples and are essential for monitoring the system performance of immunochemical assays. Include QC or other commercially available quality control materials that cover at least two levels of analyte. More frequent use of controls or the use of additional controls is left to the discretion of the user based on good laboratory practices or laboratory accreditation requirements and applicable laws. Follow manufacturer's instructions for reconstitution and storage. Each laboratory should establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. Quality control results that do not fall within acceptable ranges may indicate invalid test results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(For more details, see the data sheet "APPENDIX")

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

Sensitivity

Limit of Detection (LoD): 2.61 pg/mL

Specificity

The antibody used in the immunoassay is highly specific for Inhibin A.

Precision

Intra-assay

Samples were assayed 25 times in the same series. The coefficients of variation were found below or equal to 4.6% for serum samples.

Inter-assay

Samples were assayed in duplicate in 10 different series. The coefficients of variation were found below or equal to 6.9% for serum samples.

Accuracy

Dilution test

High-concentration samples were serially diluted with the zero calibrator. The recovery percentages obtained were between 97.8% and 117%.

Recovery test

Low-concentration samples were spiked with known quantities of Inhibin A. The recovery percentages obtained were between 83.5% and 99.5%.

Measurement range (from Limit of detection to highest calibrator): 2.61 to approximately 1,000 pg/mL.

LIMITATIONS

- The reagents supplied in this kit are optimized to measure inhibin A levels in serum or plasma.
- For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the sample. Samples from individuals which have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays. Additionally, other heterophile antibodies such as human antgoat antibodies may be present in samples.^{22,23} Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.
- If there is evidence of microbial contamination or excessive turbidity in a reagent, discard the vial.
- The Inhibin A ELISA results should be interpreted in light of the total clinical presentation of the patient, including: symptoms, clinical history, data from additional tests, and other appropriate information.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

RÉSERVÉ À UN USAGE PROFESSIONNEL,

Le kit de dosage immunoabsorbant lié à une enzyme Inhibin A (ELISA) contient les matériaux nécessaires à la mesure quantitative de l'inhibine A dimère dans le sérum et le plasma humains. Il est prévu strictement pour un usage *in vitro* pour faciliter le diagnostic et le contrôle de plusieurs problèmes reproductifs hormonaux. Le dépistage de la trisomie 21 au cours du 2e trimestre à l'aide de marqueurs ultrasoniques et biochimiques combinés peut être testé à l'aide d'algorithmes appropriés pouvant être exécutés sur des logiciels de calcul de risque disponibles dans le commerce.^{24, 25} Nous vous recommandons fortement d'utiliser un logiciel validé (avec marque CE) destiné spécifiquement à l'évaluation du risque de Trisomie 21, par ex. le logiciel alpha.* Le kit Inhibin A est prévu pour un usage combiné avec hAFP + hCG + uE3.

RÉSUMÉ

Les inhibines sont des hormones protéiniques hétérodimères secrétées par les cellules de la granulosa de l'ovaire chez la femme et les cellules de Sertoli du testicule chez l'homme. Elles inhibent sélectivement la sécrétion de la FSH (hormone folliculo-stimulante) par l'hypophyse et ont aussi des actions locales paracrines dans les gonades.^{1, 2}

La forme terminée de la molécule d'inhibine a une masse moléculaire d'environ 32 kD et est constituée de deux chaînes distinctes (α et β), reliées par des ponts disulfures. Les formes de poids moléculaire supérieur, avec des formes précurseurs de la sous-unité α , se trouvent aussi dans le fluide folliculaire et le sérum. De plus, des formes libres de la sous-unité α , non associées à une sous-unité β , et sans activité biologique d'inhibine sont aussi présentes.^{3, 4, 5, 6}

Inhibin A consiste en une sous-unité α et une sous-unité β_A . Les mesures de l'inhibine A se sont révélées utiles dans l'étude de son rôle dans la physiologie reproductive humaine.^{7, 8, 9} Plusieurs rapports publiés indiquent l'utilité de la mesure de l'inhibine A comme marqueur endocrinien pour le contrôle de la fonction ovarienne.^{10, 11, 12, 13, 14, 16, 17} Jusque récemment, il n'était pas possible de faire la distinction entre l'inhibine dimère fonctionnelle circulante et la sous-unité α libre dans le cycle menstruel humain normal.

Cependant, grâce à la paire d'anticorps fortement caractérisés, ELISA à deux sites en "sandwich" peut mesurer spécifiquement uniquement l'inhibine A dimère.¹⁸

PRINCIPE

Le test Inhibin A ELISA est une analyse de type "sandwich" à deux sites amplifiée enzymatiquement. Lors du dosage, les calibreurs, contrôles et échantillons sont incubés dans des puits de microtitration enduits d'un anticorps de la sous-unité anti-inhibine β_A . Après incubation et lavage, l'anticorps de détection de la sous-unité anti-inhibine alpha marqué de peroxydase de raifort (HRP) est ajouté dans chaque puits. Après une deuxième incubation et une étape de lavage, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté aux puits.

Une solution d'arrêt acide est enfin ajoutée. Le degré de réaction enzymatique du substrat est déterminé par la mesure de l'absorbance sous deux longueurs d'onde à 450 nm et entre 600 et 630 nm. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration des échantillons en inhibine A. Un jeu de Calibreurs Inhibin A est utilisé pour tracer une courbe Étalon d'absorption en fonction de la concentration en inhibine A. Les concentrations d'inhibine A dans les échantillons peuvent ensuite être calculées à partir de la courbe Étalon.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*.

Observez les bonnes pratiques de laboratoire.¹⁹

Les échantillons et les produits dérivés du sang sont habituellement traités avec un minimum de risque en utilisant la procédure décrite. Il est cependant conseillé de manipuler ces produits comme potentiellement infectieux en suivant les précautions universelles et les bonnes pratiques d'usage en laboratoires cliniques, indépendamment de leur origine, leur traitement ou leur certification antérieure.²⁰ Utilisez un désinfectant approprié pour la décontamination. Stockez et éliminez ces matériaux et leur emballage conformément à la réglementation et aux directives locales.

CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Calibrators / Controls

ATTENTION



H317

Peut provoquer une allergie cutanée.

H412

Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273

Éviter le rejet dans l'environnement.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P333+P313

En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

P362+P364

Enlever les vêtements contaminés et les laver avant utilisation.
masse de réaction de:
5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one
[no CE 247-500-7] et
2-méthyl-4-isothiazolin-3-one
[no CE 220-239-6] (3:1)
<0,05 %

Antibody Enzyme
Conjugate Concentrate

ATTENTION



H316

Provoque une légère irritation cutanée.

H317

Peut provoquer une allergie cutanée.

H412

Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P273

Éviter le rejet dans l'environnement.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P332+P313

En cas d'irritation cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

P333+P313







En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.

P362+P364

Enlever les vêtements contaminés et les laver avant utilisation.
Acide
3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropane sulfonique, sel de sodium 1 - 2 %
masse de réaction de:
5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one
[no CE 247-500-7] et
2-méthyl-4-isothiazolin-3-one
[no CE 220-239-6] (3:1)
<0,05 %

Sample Buffer A

DANGER

				P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant utilisation. Eau oxygénée-urée 10 - 20 %	
		H316	Provoque une légère irritation cutanée.			
		H318	Provoque de graves lésions des yeux.		masse de réaction de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [no CE 247-500-7] et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [no CE 220-239-6] (3:1) < 0,05 %	
		P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.	Conjugate Diluent	DANGER	
		P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.			
		P310	EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.			
		P332+P313	En cas d'irritation cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin. Laurylsulfate de sodium 1 - < 3 % Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (aminométhane) 1 - 2 % Alcool, C12-14 secondaire, éthoxylé 3 - 5 %		H316	Provoque une légère irritation cutanée.
					H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
					H318	Provoque de graves lésions des yeux.
					H412	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
					P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
					P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.
					P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
Sample Buffer B	DANGER				P310	EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
					P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.
					P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant utilisation. Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (aminométhane) 1 - 3 % Alcool, C12-14 secondaire, éthoxylé 3 - 5 %
		H314	Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.			masse de réaction de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [no CE 247-500-7] et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [no CE 220-239-6] (3:1) < 0,05 %
		H317	Peut provoquer une allergie cutanée.			
		P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.			
		P303+P361+P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : rincer la peau à l'eau.			
		P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.			
		P310	EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.	Solution d'arrêt A	DANGER	
		P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : demander un avis médical/consulter un médecin.			
					H314	Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.
P301+P330+P331	EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. Ne PAS faire vomir.
P303+P361+P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : rincer la peau à l'eau.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310	EN CAS d'exposition : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

- Suivre les recommandations du fabricant du tube de prélèvement sanguin concernant la centrifugation.

Chaque laboratoire doit déterminer l'acceptabilité de ses propres tubes de prélèvement de sang et produits de séparation du sérum. Des variations peuvent exister pour ces produits entre les fabricants et, parfois, de lot à lot.

Évitez congélation et décongélation répétées des échantillons.

Éviter de doser des échantillons lipémiques, ictériques ou hémolysés.

MATÉRIEL FOURNI

Kit pour la détermination des Inhibin A: 96 puits (Cat. réf. #DSL-10-28100T-1)

Plaque de microtitration enduite (bandelettes) Anti-Inhibin A: Un porte-bandelette, contenant 96 puits de microtitration.

Puits de microtitration en polystyrène avec de l'anti-inhibine β_A immobilisée sur la paroi intérieure de chaque puits.

Conserver à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption dans le sachet étanche refermable avec un dessicatif pour protéger de l'humidité.

Concentré de conjugué enzyme-anticorps Inhibin A: un flacon 0,6 mL

Conjugué HRP-anticorps monoclonal souris de sous-unité anti-inhibine α , MOPSO, BSA et < 1,0 % de ProClin** 300.

Conserver à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Diluer avant d'utiliser dans le diluant conjugué.

Calibrateurs: Six flacons 1,0 mL et un flacon 2,0 mL de "zéro" (prêt à l'emploi)

Concentrations d'environ 0, 10, 30, 100, 250, 500 et 1000 pg/mL d'inhibine A dimère recombinante dans du sérum bovin avec <0,5% de ProClin 300.

Consultez les étiquettes des flacons pour connaître les concentrations exactes.

Conserver non ouvert à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Stable à 2 à 8°C pendant 28 jours après la première utilisation. Pour de plus longues périodes, stocker dans un congélateur à -20°C (-15°C à -24°C) jusqu'à la date de péremption.

La mesurande (substance à analyser) dans les calibreurs Inhibin A est traçable par rapport à la Première norme internationale de l'Organisation mondiale de la santé pour Inhibin A (code 91/624) contenant de l'inhibine A humaine 32 kDa recombinante (1 pg/mL ou 0,037 UI/mL). Les valeurs attribuées ont été établies à partir d'échantillons représentatifs de ce lot de Étalon et sont spécifiques aux méthodologies de dosage des réactifs. Les valeurs attribuées par d'autres méthodologies peuvent être différentes. De telles différences, si elles sont présentes, peuvent être provoquées par des écarts systématiques inter-méthode.

Contrôles: deux flacons 1,0 mL (prêt à l'emploi)

Concentrations basse et haute d'inhibine A dimère recombinante dans du sérum bovin avec < 0,5 % de ProClin 300.

Les valeurs attendues sont dans la gamme de concentration indiquée sur le supplément.

Conserver non ouvert à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Stable à 2 à 8°C pendant 28 jours après la première utilisation. Pour de plus longues périodes, stocker dans un congélateur à -20°C (-15°C à -24°C) jusqu'à la date de péremption.

Tampon A pour échantillon: une bouteille 10,0 mL

Solution tampon avec albumine sérique bovine (BSA), sérum animal (chèvre, souris), surfactant et azide de sodium.

Conserver à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Tampon B pour échantillon: une bouteille 10,0 mL

Solution tampon avec < 20 % d'urée-peroxyde d'hydrogène, < 0,5 % de ProClin 300 et de l'azide de sodium.

Conserver à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Solution chromogène TMB: une bouteille 11,0 mL

Tétraméthylbenzidine (TMB) dans un tampon de citrate avec peroxyde d'hydrogène.

Conserver à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Solution d'arrêt A: une bouteille 11,0 mL

0,2 M d'acide sulfurique.

Wash solution (20x)

DANGER



H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.

P201 Se procurer les instructions avant utilisation.

P280 Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.
Acide borique 0,1 - 0,3 %
Borate de sodium décahydraté 0,1 - 0,3 %



La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse beckmancoulter.com/techdocs

PRELEVEMENT, PREPARATION, CONSERVATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

Les échantillons recommandés sont le sérum et le plasma.

Respectez les recommandations ci-dessous pour la manipulation, le traitement et le stockage des échantillons sanguins:²¹

- Prélever tous les échantillons sanguins en observant les précautions de routine concernant la ponction veineuse.
- Garder les tubes toujours bouchés.
- Dans les deux heures suivant la centrifugation, transférez au moins 500 μ L d'échantillon exempt de cellules vers un tube de stockage. Bouchez hermétiquement le tube immédiatement.
- Stockez les échantillons dilués ou non dilués fermés hermétiquement à 2 à 8°C pendant 24 heures maximum.
- Si le dosage n'est pas effectué dans les 24 heures ou pour l'expédition d'échantillons, congelez à -20°C ou moins pendant 30 jours maximum.

Respectez les indications suivantes lors de la préparation des échantillons:

- S'assurer que toute fibrine résiduelle et toute matière cellulaire ont été éliminées avant l'analyse.

Conserver à 2 à 8 °C ou à température ambiante (18-25 °C) jusqu'à la date de péremption.

Diluant pour le conjugué: une bouteille 15,0 mL

Solution tampon avec BSA, sérum animal (chèvre, souris), surfactant et < 1,0 % de ProClin 300.

Conserver à 2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption.

Concentré de lavage U (20X): Une bouteille 50,0 mL

Solution concentrée, à diluer avant usage.

Conserver à 2 à 8 °C ou à température ambiante (18-25 °C) jusqu'à la date de péremption.

Kit pour la détermination des Inhibin A: 384 puits (Cat. réf. #DSL-10-28100T-4)

Plaque de microtitration enduite (bandelettes) Anti-Inhibin A: Quatre porte-bandelettes, contenant chacun 96 puits de microtitration.

Concentré de conjugué enzyme-anticorps Inhibin A: quatre flacons 0,6 mL

Calibrateurs: deux jeux (douze flacons) 1,0 mL et deux flacons 2,0 mL de "zéro" (prêt à l'emploi)

Contrôles: deux jeux (quatre flacons) 1,0 mL (prêt à l'emploi)

Tampon A pour échantillon: quatre bouteilles 10,0 mL

Tampon B pour échantillon: une bouteille 30,0 mL

Solution chromogène TMB: une bouteille 50,0 mL

Solution d'arrêt A: deux bouteilles 11,0 mL

Diluant pour le conjugué: quatre bouteilles 15,0 mL

Solution de lavage (20x) : 2 flacons de 50 mL

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

En plus de l'équipement de laboratoire usuel, il est nécessaire d'utiliser le matériel suivant :

- Lecteur de plaque de microtitration capable d'effectuer des mesures d'absorbance à 450 nm et de préférence capable d'une correction en longueur d'onde double à 600 et 630 nm
- Eau désionisée
- Pipette de précision pour délivrer 50 à 100 µL
- Agitateur orbital de plaque microtitration pouvant effectuer 500 à 700 révolutions par minute (rpm) (tr/min)
- Laveur automatique de plaque de microtitration
- Agitateur vortex
- Tissu absorbant pour éponger les bandes
- Papier millimétré pour le traitement manuel des données

PROCÉDURE

Notes relatives aux procédures

- Une pleine compréhension de cette notice est nécessaire pour une bonne utilisation du produit Inhibin A ELISA.
- Il est de la responsabilité du client de valider le dosage pour leur utilisation.
- Des résultats fiables ne peuvent être obtenus que par des techniques de laboratoire précises suivant à la lettre les instructions de la notice.
- Effectuer simultanément la courbe standard et le dosage des échantillons.
- Amenez tous les réactifs du kit à la température ambiante (18-25°C) avant usage.
- Mélangez soigneusement les réactifs par inversion douce avant l'utilisation.
- Ne mélangez pas les composants, quels qu'ils soient, de plusieurs lots au cours d'un même dosage.
- N'utilisez aucun des composants au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Un lavage incomplet affectera défavorablement les résultats et la précision du dosage.

- Pour minimiser tout décalage potentiel du dosage suite à la variation du temps d'incubation du substrat, il faudra prendre soin d'ajouter la solution d'arrêt dans les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution chromogène TMB.
- Manipuler tous les réactifs délicatement pour éviter d'introduire des contaminants microbiens qui pourraient endommager les réactifs, particulièrement le Diluant conjugué et la Solution tampon A.
- Évitez toute contamination de la solution chromogène TMB par les conjugués.
- Utilisez un embout de pipette jetable propre pour chaque réactif, calibrateur, contrôle ou échantillon.
- Pour distribuer l'acide sulfurique et la solution chromogène TMB, évitez les pipettes avec des parties métalliques.
- L'enzyme utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est très sensible à la contamination microbienne, à l'azide de sodium, à l'acide hypochloreux et aux hydrocarbures chlorés aromatiques souvent présents dans l'eau courante du laboratoire.
- Utilisez de l'eau déionisée.
- Évitez l'exposition des réactifs à la chaleur excessive ou à la lumière directe du soleil pendant le stockage et l'incubation.

Préparation des réactifs

1. **Solution de lavage :** verser le contenu du flacon dans 950 mL d'eau distillée et homogénéiser. La solution diluée peut être stockée entre 18 et 25 °C pendant un mois ou entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption du kit.
2. **Solution de conjugué d'anticorps Inhibin A-enzyme:** 1 part de concentré conjugué d'anticorps Inhibin A-enzyme doit être diluée dans 50 parts du diluant de conjugué Inhibin A en fonction du nombre de puits utilisés. Pour une microplaque entière, pipetez exactement 220 L du concentré de conjugué d'anticorps Inhibin A-enzyme dans 11 mL du diluant du conjugué.
REMARQUE: Le concentré de conjugué d'anticorps Inhibin A-enzyme doit être fraîchement préparé 10 à 15 minutes avant utilisation.
3. **Puits de microtitration:** Sélectionnez le nombre puits enduits nécessaires pour le dosage. Les puits restants non utilisés doivent être placés dans le sachet étanche refermable avec du dessiccatif. Le sachet doit être refermé pour protéger de l'humidité.

Mode opératoire

Laissez tous les échantillons et réactifs arriver à température ambiante (18-25°C). Mélangez soigneusement les réactifs par inversion douce avant l'utilisation. Après reconstitution des réactifs, mélangez soigneusement en évitant la formation de mousse. Les calibreurs, contrôles et échantillons doivent être dosés en double.

1. Marquez les bandes de microtitration à utiliser.
2. Pipetez 50 µL de calibrateur, contrôles et échantillons dans les puits adéquats.
3. Ajoutez 50 µL du mélange tampon A dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision.
4. Ajoutez 50 µL du mélange tampon B dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision.
5. Incubez les puits, en les agitant à une vitesse de 500 à 700 rpm (tr/min) sur un agitateur orbital de microplaques pendant trois heures à température ambiante (18-25°C).
6. Préparez la solution conjuguée d'anticorps-enzyme en diluant le concentré de conjugué d'anticorps-enzyme dans le diluant de conjugué d'Inhibin A comme décrit à la section "Préparation des réactifs" de cette notice.
7. Aspirez et lavez chaque puits six fois avec la solution de lavage au moyen d'un laveur automatique de microplaque ou manuellement à l'aide d'une pipette de précision. Épongez et séchez en retournant la plaque sur du tissu absorbant.

REMARQUE :L'utilisation d'un laveur automatique de microplaque est fortement recommandée. Un lavage incomplet dégrade la précision du dosage. Si un laveur de microplaque n'est pas disponible, procédez comme suit pour laver manuellement la plaque:

(a) Aspirez complètement le liquide de chaque puits

(b) Distribuez 350 µL de solution de lavage dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision

- (c) Aspirez à nouveau le liquide
(d) Répétez cinq fois les étapes (b) et (c)

- Ajoutez 100 µL de solution conjuguée anticorps-enzyme dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision.
- Incubez les puits en les agitant à une vitesse de 500 à 700 rpm (tr/min) sur un agitateur orbital de microplaques pendant une heure à température ambiante (18-25°C).
- Aspirez et lavez chaque puits six fois avec la solution de lavage en utilisant un laveur automatique de microplaque. Épongez et séchez en retournant la plaque sur du tissu absorbant.
- Ajoutez 100 µL de solution chromogène TMB dans chaque puits à l'aide d'une pipette de précision.

Évitez l'exposition à la lumière directe du soleil.

- Incubez les puits en les agitant à une vitesse de 500 à 700 rpm (tr/min) sur un agitateur orbital de microplaques pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C).

REMARQUE: Il faut savoir que la couleur peut apparaître plus rapidement ou plus lentement que le temps d'incubation recommandé en fonction de la température ambiante locale. Surveillez visuellement le développement de la couleur pour optimiser le temps d'incubation.

- Ajoutez 100 µL de solution d'arrêt à chaque puits à l'aide d'une pipette de précision.
- Lisez l'absorbance de la solution dans les puits dans les 30 minutes au moyen d'un lecteur de microplaque réglé sur 450 nm.

REMARQUE:

1) Lors de la lecture de l'absorbance du puits de microtitration, il faut programmer le Calibrateur zéro sur "Blanc".

2) Si une correction de longueur d'onde est disponible, régler l'instrument sur une mesure de longueur d'onde double à 450 nm avec une correction de longueur d'onde de fond réglée entre 600 et 630 nm.

RÉSULTATS

- Calculez l'absorbance moyenne pour chaque calibrateur, contrôle ou échantillon.
- Tracer le logarithme des valeurs moyennes d'absorbance lues pour chacun des calibreurs le long de l'axe y en fonction du logarithme des concentrations en inhibine A en pg/mL sur l'axe x, avec un ajustement de courbe par régression linéaire. Il est aussi possible de tracer les données linéaire/linéaire et d'utiliser un ajustement de courbe spline.
- Tracez la courbe la plus ajustée possible passant par la moyenne des points de dosage en double.
- Déterminer les concentrations en inhibine A des contrôles et échantillons à partir de la courbe des Étalons en faisant correspondre les valeurs moyennes d'absorbance aux concentrations correspondantes en inhibine A.
- Tout résultat d'échantillon supérieur au calibrateur le plus élevé doit être dilué de manière appropriée à l'aide du Calibrateur 0 Inhibin A et redosé.
- Tout résultat d'échantillon plus bas que la sensibilité analytique doit être signalé comme tel.
- Multipliez la valeur par un facteur de dilution si nécessaire.

REMARQUE: Si les résultats d'absorbance dépassent les limites du lecteur de plaque, une deuxième lecture à 405 nm est nécessaire (filtre de référence entre 600 et 630 nm si disponible). Dans ce cas, il faut construire une deuxième courbe Étalon comme expliqué ci-dessus avec les résultats d'absorbance de tous les calibreurs à 405 nm. La concentration des échantillons hors échelle à 450 nm sera ensuite lue à partir de la nouvelle

courbe Étalon. Les lectures à 405 nm ne doivent pas remplacer les lectures effectuées sur l'échelle à 450 nm.

Courbe standard

Calibreurs	Conc. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Blanc)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Exemple de courbe standard, ne pas utiliser pour les calculs).

Echantillons

Pour convertir à partir d'IU/mL, utilisez l'équation suivante:

1 UI/mL (OMS 91/624) = 26,7 pg/mL

VALEURS ATTENDUES

Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles de référence pour assurer une représentation correcte des populations spécifiques. Les valeurs suivantes présentées ont été obtenues avec l'Inhibin A ELISA à l'aide d'échantillons de sérum d'adultes normaux apparemment en bonne santé. Toutes les valeurs sont données en pg/mL. Pour les femmes à cycle normal, les chiffres en dessous de chaque phase représentent le nombre de jours avant ou après le pic de LH.

Population	n	Moyenne	Médiane	Intervalle de Confiance à 95%
Femmes à cycle normal				
Début de la phase folliculaire (-14 à -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Milieu de la phase folliculaire (-9 à -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Fin de la phase folliculaire (-3 à -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Milieu du cycle (jour 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Début de la phase lutéinique (1 à 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Milieu de la phase lutéinique (4 à 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Fin de la phase lutéinique (12 à 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Niveau du pic FIV	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1 690
SOPK - Ovulatoire	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Ménopause	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Hommes normaux	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Les valeurs d'inhibine A situées en-dessous du Calibrateur 1 sont extrapolées.

Les valeurs représentées dans les tableaux ci-dessous sont des valeurs d'inhibine A dans du sérum maternel au cours du deuxième trimestre.

Semaine Terminée	Nombre d'échantillons	Inhibine A Médiane (pg/mL)	ET LOG ₁₀
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tableaux adaptés à partir de valeurs obtenues auprès d'un centre américain de dépistage (2005)

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Les contrôles Inhibin A ELISA ou les autres contrôles disponibles dans le commerce doivent se trouver dans les limites de confiance établies.
- Les limites de confiance pour les contrôles Inhibin A ELISA sont imprimées sur le supplément.
- Une courbe standard complète, avec des contrôles à bas et haut niveaux doit être incluse dans chaque dosage.

- La solution chromogène TMB doit être soit incolore ou jaune très pâle. L'apparition d'une couleur bleue peut indiquer une contamination du réactif ou une instabilité.
- Les matériaux de contrôle de qualité simulent les caractéristiques des échantillons de patient et sont essentiels pour le suivi des performances du système de dosage immunochimique. Incluez les matériaux de contrôle de qualité ou autres contrôles de qualité du commerce couvrant au moins deux niveaux de la substance à analyser. L'utilisation plus fréquente des contrôles ou l'utilisation de contrôles supplémentaires est laissée à la discrétion de l'utilisateur dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire ou des exigences d'accréditation du laboratoire et des lois applicables. Suivez les instructions du fabricant pour la reconstitution et le stockage. Chaque laboratoire doit établir des valeurs moyennes et des plages acceptables pour s'assurer des performances correctes. Les résultats de contrôle de qualité ne se trouvant pas dans les plages acceptables peuvent indiquer des résultats de test non valables.

Exactitude

Epreuve de dilutions

Des échantillons de concentration élevée ont été dilués dans le calibrateur zéro de la trousse. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 97,8 % et 117 %.

Epreuve de surcharge

Des échantillons de faible concentration ont été dopés avec des quantités connues d'inhibine A. Les taux de recouvrement obtenus étaient compris entre 83,5 % et 99,5 %.

Plage de mesure (de la limite de détection au calibrateur le plus élevé) : 2,61 à 1 000 pg/mL environ.

LIMITES

- Les réactifs fournis dans ce kit sont optimisés pour mesurer les niveaux d'inhibine A dans le sérum ou le plasma.
- Pour les dosages utilisant des anticorps, il existe une possibilité d'interférence des anticorps hétérophiles dans l'échantillon. Les échantillons provenant de personnes ayant été exposées régulièrement à des animaux ou ayant fait l'objet d'immunothérapie ou de procédures de diagnostic utilisant des immunoglobulines ou fragments d'immunoglobulines peuvent produire des anticorps par exemple HAMA, pouvant interférer avec les dosages immunologiques. En outre, d'autres anticorps hétérophiles comme les anticorps humains anti-chèvre peuvent être présents dans les échantillons.^{22, 23} L'interférence de tels anticorps peut provoquer des résultats erronés. Évaluez soigneusement les résultats de patients pouvant présenter de tels anticorps.
- Si une contamination microbienne ou un trouble excessif apparaît dans un réactif, éliminer le flacon.
- Les résultats du système Inhibin A ELISA doivent être interprétés au vu de la présentation clinique totale du patient, y compris : symptômes, historique clinique, données de tests supplémentaires et autres informations appropriées.

PERFORMANCES DU DOSAGE

(Voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

Les données représentatives ne sont fournies qu'à titre d'illustration. Les performances obtenues dans les laboratoires individuels peuvent varier.

Sensibilité

Limite de détection: 2,61 pg/mL

Spécificité

L'anticorps utilisé dans l'immunodosage est hautement spécifique à l'inhibine A.

Précision

Intra-essai

Des échantillons ont été dosés 25 fois dans une même série. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 4,6 %.

Inter-essais

Des échantillons ont été dosés en doublet dans 10 séries différentes. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs ou égaux à 6,9 %.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

NUR ZUR VERWENDUNG DURCH FACHKRÄFTE,

Der Inhibin A enzymgekoppelte Immunabsorptionstest (ELISA) besteht aus Materialien zur quantitativen Messung des dimeren Inhibin A in menschlichem Serum oder Plasma. Der Verwendungszweck dient ausschließlich der *In-vitro*-Verwendung zur Hilfe bei der Diagnose und Überwachung verschiedener hormoneller Fortpflanzungsstörungen. Das Down-Syndrom-Screening (Trisomie 21) im zweiten Trimester mit kombinierten biochemischen und Ultraschall-Markern, kann mithilfe entsprechender Algorithmen, die in käuflich erhältlicher Risiko- Berechnungssoftware enthalten sind, durchgeführt werden. 24, 25 Es wird dringend empfohlen, validierte (CE-gekennzeichnete) Software zu verwenden, die spezifisch zur Risikobewertung von Trisomie 21 vorgesehen ist, zum Beispiel die Software „alpha“. Das Inhibin A-Kit ist in Kombination mit hAFP + hCG + uE3 zu verwenden.

ZUSAMMENFASSUNG

Inhibine sind heterodimere Proteohormone, die im weiblichen Körper in den Granulosazellen der Eierstöcke und im männlichen Körper in den Sertolizellen der Hoden gebildet werden. Sie unterdrücken selektiv die Ausschüttung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) aus der Hypophyse und zeigen ebenfalls eine lokale, parakrine Wirkung auf die Gonaden.^{1,2}

Die vollständig ausgebildete Form des Inhibinmoleküls hat ein Molekulargewicht von ungefähr 32 kD und besteht aus zwei einzelnen Ketten (α und β), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Es treten ebenfalls Formen mit einem höheren Molekulargewicht in der Follikelflüssigkeit und im Serum auf, die Vorstufen der α -Untereinheit enthalten. Zusätzlich gibt es freie Formen von α -Untereinheiten, die nicht an β -Untereinheiten gebunden sind und keine Inhibin-Bioaktivität aufweisen.^{3,4,5,6}

Inhibin A besteht aus einer α -Untereinheit und einer β_A -Untereinheit. Messungen des Inhibin A haben sich bei der Erforschung seiner Rolle im menschlichen Fortpflanzungsapparat als hilfreich erwiesen.^{7,8,9} In mehreren Veröffentlichungen wird der Nutzen der Messung von Inhibin als indokriner Marker zur Überwachung der Ovarialfunktion herausgestellt.^{10,11,12,13,14,16,17} Bis vor kurzem war eine Unterscheidung zwischen zirkulierendem funktional dimerem Inhibin und der freien α -Untereinheit im normalen Menstruationszyklus nicht möglich.

Durch die Verwendung des hochspezifischen Antikörperpaars stellte sich heraus, dass mithilfe des zweischrittigen „Sandwich“-ELISA, speziell das dimere Inhibin A gemessen werden kann.¹⁸

PRINZIP

Der Inhibin A ELISA ist ein enzymatisch verstärkter „Sandwich“-Assay in zwei Schritten. Bei dem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Proben in Mikrotitervertiefungen inkubiert, die mit einem Anti-Inhibin- β_A -Untereinheit-Antikörper beschichtet sind. Nach der Inkubation und dem Waschen wird jeder Vertiefung ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekennzeichnete Anti-Inhibin- Alpha-Detektionsantikörper hinzugefügt. Nach einem zweiten Inkubations- und Waschschrift wird Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat in die Vertiefungen gegeben.

Zum Schluss wird eine saure Stopperlösung hinzugefügt. Der Grad der enzymatischen Umsetzung des Substrats wird durch eine Doppelwellenlängen-Absorptionsmessung bei 450 nm und zwischen 600 und 630 nm bestimmt. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur Konzentration von Inhibin A in den Proben. Ein Inhibin A-Kalibratoren wird verwendet, um eine Standardkurve der Absorption gegenüber der Inhibin A-Konzentration zu plotten. Aus dieser Standardkurve kann dann die Inhibin A-Konzentration in den Proben berechnet werden.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum.

Befolgen Sie die GLP-Regeln (GLP-Gute Laborpraxis).¹⁹

Unter Verwendung des beschriebenen Verfahrens können Proben und aus Blut gewonnene Produkte routinemäßig mit minimalem Risiko verarbeitet werden. Dennoch müssen diese Produkte als potentiell infektiös gemäß den allgemein geltenden Vorsichtsmaßnahmen und besten Praktiken für klinische Labors gehandhabt werden, unabhängig von ihrer Herkunft, Behandlung oder vorheriger Zertifizierung.²⁰ Zur Dekontamination ist ein geeignetes Desinfektionsmittel zu verwenden. Materialien und Behälter sind gemäß den lokal geltenden Vorschriften und Richtlinien zu lagern und entsorgen.

PI-DSL1028100T-04

GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Calibrators / Controls ACHTUNG



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
	Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1) <0,05 %

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate ACHTUNG



H316	Verursacht leichte Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P332+P313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
	3-Morpholino-2-hydroxy-propansulfons Natriumsalz 1 - 2 % Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1) <0,05 %

Sample Buffer A GEFAHR



H316	Verursacht leichte Hautreizungen.
------	-----------------------------------

Wash solution (20x)

GEFAHR



H360

Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

P201

Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P308+P313

BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Borsäure 0,1 - 0,3 %
di-Natriumtetraborat-Decahydrat 0,1 - 0,3 %



Das Sicherheitsdatenblatt ist unter beckmancoulter.com/techdocs verfügbar

PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND VERDÜNNUNG

Die empfohlenen Proben sind Serum und Plasma.

Beachten Sie die folgenden Empfehlungen für Handhabung, Verarbeitung und Lagerung von Blutproben:²¹

- Bei der Entnahme sämtlicher Blutproben sind die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für die Venenpunktion einzuhalten.
- Röhrchen stets verschlossen halten.
- Innerhalb von zwei Stunden nach dem Zentrifugieren mindestens 500 µL der zellfreien Probe in ein Lagerröhrchen umfüllen. Röhrchen sofort dicht verschließen.
- Unverdünnte oder verdünnte Proben dicht verschlossen bei 2 to 8°C für höchstens 24 Stunden lagern.
- Wenn der Assay nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt wird oder die Proben versendet werden, die Proben bei -20°C oder kälter für bis zu 30 Tage einfrieren.

Beim Vorbereiten der Proben die folgenden Richtlinien beachten:

- Sicherstellen, dass Fibrin-Reste und Zellbestandteile vor der Analyse entfernt werden.
- Beachten Sie die Empfehlungen des Blutentnahmeröhrchen-Herstellers im Hinblick auf das Zentrifugieren.

Jedes Labor sollte die Eignung seiner eigenen Blutentnahmeröhrchen und Seruntrennartikel ermitteln. Diese Artikel können von Hersteller zu Hersteller und mitunter auch von Los zu Los unterschiedlich ausfallen.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden.

Lipämische, ikterische oder hämolytische Proben möglichst nicht zur Analyse heranziehen.

MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Kit zur Bestimmung von Inhibin A: 96 Mikrotitervertiefungen (Kat.-Nr. #DSL-10-28100T-1)

Anti-Inhibin A-Beschichtete Mikrotiterplatte (Streifen): Ein Streifenhalter mit 96 Mikrotitervertiefungen.

Polystyrol-Mikrotitervertiefungen mit Anti-Inhibin β_A , das an der Innenwand der Vertiefungen immobilisiert ist.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel zum Schutz gegen Feuchtigkeit lagern.

Inhibin A-Antikörper-Enzym-Konjugat-Konzentrat: ein Fläschchen 0,6 mL

Maus-monoklonales Anti-Inhibin- α -Untereinheit Antikörper-HRP-Konjugat, MOPSO, BSA und < 1,0 % ProClin** 300.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C lagern.

Vor der Verwendung in Konjugatdiluent verdünnen.

Standard: Sechs Fläschchen 1,0 mL und ein Fläschchen 2,0 mL mit "null" (gebrauchsfertig)

Konzentrationen von ungefähr 0, 10, 30, 100, 250, 500 und 1000 pg/mL eines rekombinanten dimeren Inhibin A in bovinem Serum mit <0,5% ProClin 300.

Die exakten Konzentrationen sind den Etiketten der Fläschchen zu entnehmen.

Bis zum Verfallsdatum ungeöffnet bei 2 bis 8 °C lagern.

Nach erster Verwendung bei 2 bis 8°C für 28 Tage stabil. Für längere Zeiträume bis zum Verfallsdatum in einem -20°C kalten Gefrierschrank (-15°C bis -24°C) lagern.

Das Messreagenz (Analyt) in den Inhibin A-Kalibrator ist auf den ersten internationalen Standard der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Inhibin-A (Code 91/624) zurückzuführen, das 32 kDa eines rekombinanten menschlichen Inhibin A (1 pg/mL oder 0,037 IU/mL) enthält. Die zugewiesenen Werte wurden mithilfe repräsentativer Proben aus dieser Standardcharge ermittelt und gelten ausschließlich für die Assay-Methoden der Reagenzien. Die durch andere Methoden ermittelten Werte können unterschiedlich sein. Etwaige Unterschiede dieser Art können auf methodenspezifische Abweichungen zurückzuführen sein.

Kontrollen: zwei Fläschchen 1,0 mL (einsatzbereit)

Niedrige und hohe Konzentrationen eines rekombinanten dimeren Inhibin A in bovinem Serum mit < 0,5 % ProClin 300.

Die erwarteten Werte finden Sie auf einem Beipackzettel.

Bis zum Verfallsdatum ungeöffnet bei 2 bis 8 °C lagern.

Nach erster Verwendung bei 2 bis 8°C für 28 Tage stabil. Für längere Zeiträume bis zum Verfallsdatum in einem -20°C kalten Gefrierschrank (-15°C bis -24°C) lagern.

Probenpuffer A: eine Flasche 10,0 mL

Puffer mit bovinem Serumalbumin (BSA), tierischem Serum (Ziege, Maus), oberflächenaktivem Stoff und Natriumazid.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C lagern.

Probenpuffer B: eine Flasche 10,0 mL

Puffer mit < 20 %-igem Harnstoffwasserstoffperoxid, < 0,5 % ProClin 300 und Natriumazid.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C lagern.

TMB-Chromgenlösung: eine Flasche 11,0 mL

Tetramethylbenzidine (TMB) in Citratpuffer mit Wasserstoffperoxid.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C lagern.

Stopperlösung A: eine Flasche 11,0 mL

0,2 M Schwefelsäure.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C oder Zimmertemperatur (18-25°C) lagern.

Konjugat-Verdünnungsmittel: eine Flasche 15,0 mL

Puffer mit BSA, tierischem Serum (Ziege, Maus), oberflächenaktivem Stoff und < 1,0 % ProClin 300.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C lagern.

Waschkonzentrat U (20X): Eine Flasche 50,0 mL

Die konzentrierte Lösung muss vor Gebrauch verdünnt werden.

Bis zum Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C oder Zimmertemperatur (18-25°C) lagern.

Kit für die Bestimmung von Inhibin A: 384 Mikrotitervertiefungen (Kat. #DSL-10-28100T-4)

Anti-Inhibin A-Beschichtete Mikrotiterplatte (Streifen): Vier Streifenhalter mit je 96 Mikrotiter-Vertiefungen.

Inhibin A-Antikörper-Enzym-Konjugat-Konzentrat: vier Fläschchen 0,6 mL

Standard: zwei Sätze (zwölf Fläschchen) 1,0 mL und zwei Fläschchen 2,0 mL mit "null" (gebrauchsfertig)

Kontrollen: zwei Sätze (vier Fläschchen) 1,0 mL

Probenpuffer A: vier Flaschen 10,0 mL

Probenpuffer B: drei Flasche 10,0 mL

TMB-Chromogenlösung: eine Flasche 50,0 mL

Stopperlösung A: vier Flaschen 11,0 mL

Konjugat-Verdünnungsmittel: vier Flaschen 15,0 mL

Waschlösung (20x): zwei 50 mL Flaschen

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

- Mikrotiterplatten-Reader für Absorptionsmessung bei 450 nm und vorzugsweise für Doppelwellenlängenkorrektur zwischen 600 und 630 nm geeignet
- Deionisiertes Wasser
- Präzisionspipette für 50–100 µL
- Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten für 500–700 Umdrehungen pro Minute (rpm)
- Mikrotiterplatten-Wascher
- Vortexmischer
- Saugfähige Unterlage zum Trocknen der Streifen
- Millimeterpapier zur manuellen Datenauswertung

DURCHFÜHRUNG

Verfahrenshinweise

- Für die erfolgreiche Nutzung des Inhibin A-ELISA ist ein gründliches Verständnis dieser Packungsbeilage erforderlich.
- Der Kunde ist dafür verantwortlich, die Assays für die gegebene Verwendung zu validieren.
- Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, sind präzise Laborverfahren und genaues Befolgen der Packungsbeilage zwingend erforderlich.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (18-25°C) bringen.
- Reagenzien vor dem Gebrauch durch vorsichtiges Schwenken gründlich mischen.
- Keine Kitkomponenten verschiedener Chargen mischen.
- Keine Komponenten nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Unvollständiges Waschen verfälscht das Ergebnis und die Assay-Präzision.
- Um einen potentiellen Drift des Assays aufgrund unterschiedlicher Substrat-Inkubationszeiten zu vermeiden, sollte darauf geachtet werden, die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit in die Vertiefungen zu geben wie die TMB Chromogen-Lösung.
- Beim Umgang mit den Reagenzien vorsichtig vorgehen und den Eintrag von potenziell für die Reagenzien schädlichen mikrobieller Kontamination vermeiden. Dies gilt insbesondere für Konjugatdiluent und Probenpuffer A.
- Kontamination der TMB Chromogen-Lösung mit den Konjugaten vermeiden.
- Für die Reagenzien, Kalibratoren, Kontrollen und Proben jeweils eine saubere Einweg-Pipettenspitze verwenden.

- Zum Pipettieren von Schwefelsäure und TMB Chromogen-Lösung Pipetten mit Metallteilen vermeiden.
- Das als Marker verwendete Enzym wird durch Sauerstoff inaktiviert und reagiert hoch empfindlich auf mikrobielle Kontamination, Natriumazid, Hypochlorsäure und aromatische Chlorkohlenwasserstoffe, die in den Wasseraufbereitungsanlagen von Laboren häufig vorkommen.
- Deionisiertes Wasser verwenden.
- Reagenzien bei Lagerung und Inkubation nicht übermäßiger Wärme oder direktem Sonnenlicht aussetzen.

Reagenzienvorbereitung

1. **Waschlösung:** Den Inhalt des Fläschchens in 950 mL destilliertes Wasser geben und homogenisieren. Die verdünnte Lösung kann einen Monat lang bei 18–25 °C oder bis zum Verfallsdatum des Kits bei 2–8 °C aufbewahrt werden.
2. **Inhibin A-Antikörper-Enzym-Konjugatlösung:** Das Inhibin A-Antikörper- Enzym-Konjugatkonzentrat sollte entsprechend der Anzahl der verwendeten Vertiefungen im Verhältnis 1 Teil auf 50 Teile Inhibin A Konjugat-Verdünnungsmittel verdünnt werden. Pipettieren Sie für eine gesamte Platte exakt 220 µL des Inhibin A-Antikörper-Enzym- Konjugatkonzentrats in 11 mL des Konjugat-Verdünnungsmittels.
HINWEIS: Das Inhibin A-Antikörper-Enzym-Konjugatkonzentrat sollte 10–15 Minuten vor Gebrauch frisch verdünnt werden.
3. **Mikrotitervertiefungen:** Die Anzahl der für den Assay erforderlichen Vertiefungen bestimmen. Die übrigen, unbenutzten Vertiefungen sollten in wiederverschließbaren Beuteln zum Schutz gegen Feuchtigkeit aufbewahrt werden.

Testdurchführung

Alle Proben und Reagenzien Zimmertemperatur (18-25°C) erreichen lassen. Reagenzien vor dem Gebrauch durch vorsichtiges Schwenken mischen. Nach Rekonstituierung Reagenzien gründlich, aber ohne Schaumbildung mischen. Kalibratoren, Kontrollen und Proben sollten als Doppelbestimmung durchgeführt werden.

1. Die zu verwendenden Mikrotiterstreifen kennzeichnen.
2. 50 µL der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
3. In jede Vertiefung mit einer Multipipette 50 µL des Probenpuffers A hinzugeben.
4. In jede Vertiefung mit einer Multipipette 50 µL des Probenpuffers B hinzugeben.
5. Die Vertiefungen auf einem Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten mit 500–700 rpm für drei Stunden bei Zimmertemperatur (18-25°C) inkubieren.
6. Die Antikörper-Enzym-Konjugatlösung vorbereiten, indem das Antikörper- Enzym-Konjugatkonzentrat in dem Inhibin A-Konjugat-Verdünnungsmittel so verdünnt wird, wie im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien“ auf dieser Packungsbeilage beschrieben.
7. Jede Vertiefung sechs Mal absaugen oder dekantieren und mit Waschlösung waschen. Dies kann automatisch mit einem Mikroplatten-Wascher oder manuell mit einer Multipipette erfolgen. Platte dekantieren und auf einer saugfähigen Unterlage trocken klopfen.

HINWEIS: Es wird dringend empfohlen, einen automatischen Mikrotiterplatten-Wascher zu verwenden. Unvollständiges Waschen verfälscht die Assay-Präzision. Wenn kein Mikrotiterplatten-Wascher verfügbar ist, befolgen Sie diese Schritte, um die Platten manuell zu waschen:

- (a) Flüssigkeit aus jeder Vertiefung vollständig absaugen oder dekantieren
 - (b) In jede Vertiefung mit einer Präzisionspipette 350 µL der Waschlösung geben
 - (c) Flüssigkeit erneut absaugen oder dekantieren
 - (d) Schritte (b) und (c) fünf Mal wiederholen
8. In jede Vertiefung mit einer Multipipette 100 µL der Antikörper-Enzym-Konjugatlösung zugeben.
 9. Die Vertiefungen auf einem Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten mit 500–700 rpm für eine Stunde bei Zimmertemperatur (18-25°C) inkubieren.

- Jede Vertiefung sechs Mal absaugen oder dekantieren und mit Waschlösung und einem automatischen Mikrotiterplatten-Wascher waschen. Platte dekantieren und auf einer saugfähigen Unterlage trocken klopfen.
- In jede Vertiefung mit einer Multipipette 100 µL der TMB-Chromgenlösung hinzugeben.

Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.

- Die Vertiefungen auf einem Orbitalschüttler für Mikrotiterplatten mit 500–700 rpm für 15 Minuten bei Zimmertemperatur (18–25°C) inkubieren.

HINWEIS: Beachten Sie, dass sich die Farbe je nach tatsächlicher Zimmertemperatur schneller oder langsamer als in der angegebenen Inkubationszeit entwickeln kann. Die Inkubationszeit kann durch Beobachtung der Farbentwicklung optimiert werden.

- In jede Vertiefung mit einer Präzisionspipette 100 µL der Stopperlösung zugeben.
- Die Absorption der Lösung in den Vertiefungen innerhalb von 30 Minuten ablesen. Dafür einen Mikrotiterplattenleser verwenden, der auf 450 nm eingestellt ist.

HINWEIS:

- Beim Messen der Absorption der Mikrotitervertiefungen muss der Nullkalibrator als „Leerwert“ programmiert werden.
- Wenn eine Wellenlängenkorrektur verfügbar ist, Instrument auf duale Wellenlängenmessung bei 450 nm mit einer Hintergrund-Wellenlängenkorrektur zwischen 600 und 630 nm einstellen.

ERGEBNISSE

- Den Absorptionsmittelwert für jeden Kalibrator, jede Kontrolle oder jede Probe berechnen.
- Den Logarithmus der mittleren Absorptionswerte für jeden Kalibrator auf der Y-Achse gegen den Logarithmus der Inhibin A-Konzentrationen in pg/mL auf der X-Achse unter Verwendung einer linearen Kurvenanpassung plotten. Alternativ können die Daten ebenfalls linear gegeneinander geplottet werden, und es kann eine geglättete Spline-Kurvenanpassung verwendet werden.
- Die zutreffendste Kurve durch den Mittelwert der Doppelpunkte zeichnen.
- Die Konzentration von Inhibin A bei den Kontrollen und Proben für die Standardkurve bestimmen, indem deren mittlere Absorptionswerte mit den entsprechenden Inhibin A-Konzentrationen zur Deckung gebracht werden.
- Alle Proben, die über dem am höchsten konzentrierten Kalibrator liegen, sollten entsprechend mit Inhibin A-Kalibrator 0 verdünnt und erneut analysiert werden.
- Alle Proben mit einem gemessenen Wert unterhalb der Analyseempfindlichkeit sollten als solche ausgewiesen werden.
- Den Wert bei Bedarf mit einem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

HINWEIS: Wenn die Absorptionswerte den linearen Messbereich des Platten-Readers überschreiten, ist eine zweite Messung bei 405 nm notwendig (Referenzfilter zwischen 600 und 630 nm, wenn verfügbar). In diesem Fall ist eine zweite Standardkurve wie oben zu erstellen, und zwar mit den Absorptionswerten aller Kalibratoren bei 405 nm. Die Konzentrationen der Proben außerhalb des Messbereichs bei 450 nm werden dann von der neuen Standardkurve abgelesen. Die Messungen bei 405 nm sollten die Messungen bei 450 nm nicht ersetzen.

Standardkurve

Kalibratoren	Konz. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Leerwert)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung benutzen).

Proben

Bitte nutzen Sie zur Umrechnung von IU/mL die folgende Gleichung:

$$1 \text{ IU/mL (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche festlegen, um die genaue Abbildung der spezifischen Populationen sicherzustellen. Die folgenden dargestellten Werte wurden mit dem Inhibin A ELISA und Serumproben von offensichtlich normalen, gesunden Erwachsenen gewonnen. Alle Werte sind in pg/mL angegeben. Bei Frauen mit regelmäßigem Zyklus stellen die Zahlen unter jeder Phase die Tage vor oder nach dem Anstieg des LH (Lutenisierendes Hormon) dar.

Population	n	Mittelwert	Median	95% Vertrauensgrenze
Frauen mit normalem Zyklus				
Frühe Follikelphase (-14 bis -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Mittlere Follikelphase (-9 bis -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Späte Follikelphase (-3 bis -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Zyklusmitte (Tag 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Frühe Lutealphase (1 bis 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Mittlere Lutealphase (4 bis 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Späte Lutealphase (12 bis 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
IVF-Spitzen	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1 690
PCOS - Ovarialsyndrom	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Postmenopausal	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Normal männlich	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Inhibin-A-Werte unterhalb Kalibrator 1 sind extrapoliert.

Die angegebenen Werte in der folgenden Tabelle beziehen sich auf maternales Serum Inhibin A im zweiten Trimester.

Abgeschlossene Woche	Anzahl der Proben	Median Inhibin A (pg/mL)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabelle wurde mit Werten aus einem Vorsorgezentrum in den USA (2005) abgeglichen.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Inhibin A ELISA-Kontrollen oder andere Fertigungskontrollen sollten sich innerhalb festgelegter Vertrauensgrenzen bewegen.
- Die Vertrauensgrenzen für Inhibin A ELISA-Kontrollen sind auf einem Beipackzettel.
- Eine vollständige Standardkurve und Kontrollen mit niedriger und hoher Konzentration sollten Bestandteil eines jeden Assays sein.
- Die TMB Chromogen-Lösung sollte farblos bis zu sehr hell gelb sein. Die Entwicklung einer blauen Farbe deutet auf Reagenzkontamination oder Instabilität hin.
- Materialien zur Qualitätskontrolle simulieren die Eigenschaften von Patientenproben und sind von grundlegender Bedeutung für die Überwachung der Systemleistung von immunochemischen Assays. Kitinterne Kontrollen oder andere handelsübliche Qualitätskontrollmaterialien sollten mindestens zwei Analytkonzentrationen abdecken. Ein häufigerer Einsatz von Kontrollen oder die Verwendung zusätzlicher Kontrollen bleiben dem Benutzer überlassen, basierend auf den GLP-Regeln oder Laborakkreditierungsanforderungen und geltenden Gesetzen. Die Herstelleranweisungen für Rekonstituierung und Lagerung befolgen. Jedes Labor sollte Mittelwerte und akzeptable Bereiche festlegen, um das richtige Leistungsverhalten sicherzustellen. Qualitätskontroll-Ergebnisse, die sich außerhalb der festgelegten Bereiche bewegen, weisen möglicherweise auf ungünstige Testergebnisse hin.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

(Für mehr Details, siehe die Beilage "APPENDIX").

Repräsentative Daten dienen nur der Veranschaulichung. Die in einzelnen Labors erzielten Leistungen können anders ausfallen.

Empfindlichkeit

Nachweisgrenze: 2,61 pg/mL

Spezifität

Der im Immunassay verwendete Antikörper ist hochspezifisch für Inhibin A.

Präzision

Intra-Assay

Proben aus derselben Serie wurden 25-mal getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 4,6 % für Serumproben.

Inter-assay

Proben wurden in Doppelbestimmung in 10 verschiedenen Serien getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils kleiner oder gleich 6,9 % für Serumproben.

Genauigkeit

Verdünnungstest

Hoch konzentrierte Proben wurden mit Nullkalibrator verdünnt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 97,8 % und 117 %.

Wiederfindungstest

Proben mit geringen Konzentrationen wurden mit bekannten Mengen von Inhibin A versetzt. Die ermittelten prozentualen Wiederfindungswerte lagen zwischen 83,5 % und 99,5 %.

Messbereich (von der Nachweisgrenze bis zum höchsten Kalibrator): 2,61 bis ca. 1 000 pg/mL.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die in diesem Kit gelieferten Reagenzien sind auf die Messung von Inhibin A-Konzentrationen in Serum oder Plasma optimiert.
 - Bei der Verwendung von Antikörpern besteht die Möglichkeit einer Interferenz durch heterophile Antikörper in der Probe. In Proben von Personen, die regelmäßig mit Tieren in Kontakt waren oder die einer Immuntherapie oder einem diagnostischen Verfahren mit Immunglobulinen oder Immunglobulinfragmenten ausgesetzt waren, können Antikörper enthalten sein, z. B. humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA), die eine Interferenz im Immunoassay verursachen. Zusätzlich dazu können andere heterophile Antikörper wie humane Anti-Ziegen-Antikörper in Proben vorhanden sein.^{22, 23} Solche störenden Antikörper können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Seien Sie vorsichtig bei der Auswertung der Ergebnisse von solchen Patienten, bei denen der Verdacht auf diese Antikörper besteht.
 - Fläschchen nicht benutzen, die Anzeichen für eine mikrobielle Kontamination zeigen oder stark getrübt sind.
 - Die Inhibin A ELISA-Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild des Patienten interpretiert werden, einschließlich: Symptome, klinische Vorgeschichte, Daten anderer Tests sowie andere relevante Informationen.
-

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

SOLO PER USO PROFESSIONALE,

Il kit del dosaggio immunoassorbente legato all'enzima Inhibin A (ELISA) fornisce materiali per la misurazione quantitativa dell'inibina A dimerica in plasma o siero umano. È pensato esclusivamente per uso *in vitro* come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio di vari disturbi ormonali riproduttivi. Lo screening della sindrome di Down (Trisomia 21) nel secondo trimestre usando marcatori a ultrasuoni e biochimici combinati può essere valutato con algoritmi appropriati che possono essere eseguiti su software per il calcolo dei rischi disponibili in commercio.^{24, 25} È fortemente raccomandato l'utilizzo di software convalidati (con contrassegno CE) progettati specificatamente per la valutazione del rischio della Trisomia 21, ad es. il software alpha.* Il kit Inhibin A è pensato per essere usato in combinazione con hAFP + hCG + uE3.

RIEPILOGO

Le inibine sono ormoni proteici eterodimeri secreti dalle cellule della granulosa nell'ovaio delle donne e nelle cellule di Sertoli nel testicolo degli uomini. Sopprimono selettivamente la secrezione dell'ormone follicolostimolante (FSH) prodotto dall'ipofisi e hanno anche azioni paracrine locali sulle gonadi.^{1, 2}

La forma completamente elaborata della molecola dell'inibina ha un peso molecolare di circa 32 kD ed è composta di due catene distinte (α e β), collegate da ponti disolfuro. Le forme di peso molecolare più elevato, con forme precursori della subunità α , sono presenti anche in fluido follicolare e nel siero. Sono inoltre presenti forme della subunità α libera, non associate con una subunità β e prive dell'attività biologica dell'inibina.^{3, 4, 5, 6}

L'Inhibin A è composta da una subunità α e da una subunità β_A . Le misurazioni dell'inibina A si sono dimostrate utili nello studio del suo ruolo nella fisiologia riproduttiva umana.^{7, 8, 9} Diversi report pubblicati indicano l'utilità della misurazione dell'inibina A come marcatore endocrino per il monitoraggio della funzione ovarica.^{10, 11, 12, 13, 14, 16, 17} Fino a poco tempo fa, non era possibile distinguere tra l'inibina dimerica funzionale in circolazione e la subunità α libera nel normale ciclo mestruale.

Tuttavia, usando la coppia di anticorpi altamente caratterizzata, l'ELISA sandwich a due siti risulta essere in grado di misurare specificatamente solo l'inibina A dimerica.¹⁸

PRINCIPIO

L'Inhibin A ELISA è un dosaggio "sandwich" a due fasi amplificato enzimaticamente. Durante l'analisi, gli calibratori, i controlli e i campioni vengono incubati in pozzetti di microtitolazione, sensibilizzati con anticorpi della subunità β_A anti-inibina. Dopo incubazione e lavaggio, in ogni pozzetto vengono aggiunti gli anticorpi di rivelazione della subunità alfa anti-inibina sensibilizzati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo una seconda incubazione e lavaggio, nei pozzetti viene aggiunto il substrato tetrametilbenzidina (TMB).

Infine, viene aggiunta una soluzione acida di arresto. Il grado di ricambio enzimatico del substrato viene determinato mediante la misura dell'assorbanza a doppia lunghezza d'onda a 450 nm e 600–630 nm. L'assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla concentrazione di inibina A nei campioni. Un set di calibratori dell'Inhibin A è usato per tracciare una curva standard dell'assorbanza rispetto alla concentrazione di inibina A. Da questa curva standard è quindi possibile calcolare le concentrazioni di inibina A nei campioni.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*.

Impiegare le buone pratiche di laboratorio.¹⁹

Utilizzando la procedura prescritta, i campioni e i prodotti emoderivati possono essere analizzati di routine con un rischio minimo. Tuttavia, manipolare questi prodotti come potenzialmente infettivi in conformità alle precauzioni universali e alle buone pratiche cliniche di laboratorio, indipendentemente dalla loro origine, trattamento o certificazione precedente.²⁰ Utilizzare un disinfettante appropriato per la decontaminazione. Conservare e smaltire questi materiali e i loro contenitori secondo le normative e le linee guida vigenti.

CLASSIFICAZIONE PERICOLI GHS

Calibrators / Controls ATTENZIONE



H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. miscela di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7]; 2-metil-4-isotiazol-3-one [n. CE 220-239-6] (3:1) <0,05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate ATTENZIONE







H316	Provoca leggera irritazione cutanea.
H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
P332+P313	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. 3-(N-morfolino)-2-idrossi acido propano sulfonico, sale sodico 1 - 2% miscela di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7]; 2-metil-4-isotiazol-3-one [n. CE 220-239-6] (3:1) <0,05%

Sample Buffer A PERICOLO



H316	Provoca leggera irritazione cutanea.
H318	Provoca gravi lesioni oculari.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.

Sample Buffer B	P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.	H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.	
	P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.	P273	Non disperdere nell'ambiente.	
	P332+P313	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.	P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.	
	PERICOLO		Tris(idrossimetil)-aminomethane (aminometano) 1 - 2% Alcool, C12-14 secondario, etossilato 3 - 5%	P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
				P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
				P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
				P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
					Tris(idrossimetil)-aminomethane (aminometano) 1 - 3% Alcool, C12-14 secondario, etossilato 3 - 5% miscela di: 5-cloro-2-metil - 4-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7]; 2-metil-4-isotiazol-3- one [n. CE 220-239-6] (3:1) < 0,05%
	H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.	Soluzione di arresto A	PERICOLO	
	H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.			
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.				
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): lavare abbondantemente con acqua.				
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.				
P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.				
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.				
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.				
	Acqua ossigenata-urea 10 - 20% miscela di: 5-cloro-2-metil - 4-isotiazol-3-one [n. CE 247-500-7]; 2-metil-4-isotiazol-3- one [n. CE 220-239-6] (3:1) < 0,05%				
		H314			
		P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.		
		P301+P330+P331	IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.		
		P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): lavare abbondantemente con acqua.		
		P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.		
		P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.		
			Acido solforico 1 - 3%		
Conjugate Diluent	PERICOLO		Wash solution (20x)	PERICOLO	
				H360	Può nuocere alla fertilità o al feto.
				P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
				P280	Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
					Provoca leggera irritazione cutanea.
				Può provocare una reazione allergica cutanea.	
				Provoca gravi lesioni oculari.	



La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile su
beckmancoulter.com/techdocs

RACCOLTA, MANIPOLAZIONE, DILUIZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Siero e plasma sono i campioni raccomandati.

Seguire le seguenti raccomandazioni per il trattamento, l'analisi e la conservazione dei campioni di sangue.²¹

- Prelevare i campioni di sangue attenendosi alle precauzioni di routine per il prelievo venoso.
- Tenere le provette sempre sigillate.
- Entro due ore dalla centrifuga, trasferire almeno 500 µL di campione in una provetta di conservazione. Tappare immediatamente la provetta.
- Conservare i campioni diluiti o non diluiti ben chiusi a 2–8°C per un periodo non superiore a 24 ore.
- Se il dosaggio non verrà eseguito entro 24 ore, o, nel caso in cui i campioni debbano essere spediti, congelare a -20°C o a una temperatura inferiore per un massimo di 30 giorni.

Durante la preparazione dei campioni, utilizzare le seguenti linee guida:

- Assicurarsi che la fibrina e la sostanza cellulare residua siano state rimosse prima di effettuare l'analisi.
- Per la centrifugazione, seguire le istruzioni del produttore delle provette di prelievo del sangue.

Ciascun laboratorio deve determinare l'accettabilità delle proprie provette di prelievo e dei prodotti per la separazione del siero. Tali prodotti possono presentare variazioni da produttore a produttore e, talvolta, da lotto a lotto.

Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni.

Non analizzare campioni lipemici, itterici o emolizzati.

MATERIALI FORNITI

Kit per il dosaggio del Inhibin A: 96 pozzetti (Cat. #DSL-10-28100T-1)

Micropiastra rivestita (strisce) Anti-Inhibin A: Uno portastrisce, contenente 96 pozzetti di microtitolazione.

Pozzetti di microtitolazione in polistirene con β_A anti-inhibina immobilizzato nella parete interna di ogni pozzetto.

Conservare a 2–8°C fino alla data di scadenza nel sacchetto richiudibile provvisto di un agente essiccante per proteggere dall'umidità.

Concentrato di coniugato Inhibin A: Una fiala, 0,6 mL

Coniugato anticorpo-HRP subunità α anti-inibina monoclonale di topo, MOPSO, BSA e < 1,0% ProClin** 300.

Conservare a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Diluire prima dell'uso in Diluente coniugato.

Calibratori: Sei fiale 1,0 mL e una fiala 2,0 mL di calibratore "zero" (pronti per l'uso)

Concentrazioni di circa 0, 10, 30, 100, 250, 500 e 1000 pg/mL di inhibina A dimerica ricombinante in siero bovino con < 0,5% ProClin 300.

L'esatta concentrazione è riportata su ciascuna etichetta.

Conservare chiuso a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Stabile a 2–8°C per 28 giorni dopo l'uso iniziale. Per periodi più lunghi, conservare in un congelatore a -20°C (da -15°C a -24°C) fino alla data di scadenza.

Il misurando (analita) negli calibratori dell'Inhibin A è tracciabile in conformità al Primo standard internazionale dell'OMS per Inhibin A (codice 91/624) contenente inhibina A umana da 32 kDa ricombinante (1 pg/mL o 0,037 IU/mL). I valori dello standard si riferiscono al lotto in uso e sono caratteristici del metodo. I valori assegnati agli standard utilizzati in altri metodi possono essere differenti per le caratteristiche diverse di ciascun metodo.

Controllo: due fiale 1,0 mL (pronti per l'uso)

Concentrazioni basse ed elevate di inhibina A dimerica ricombinante in siero bovino con < 0,5% ProClin 300.

I valori attesi sono riportati sul foglio del controllo di qualità.

Conservare chiuso a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Stabile a 2–8°C per 28 giorni dopo l'uso iniziale. Per periodi più lunghi, conservare in un congelatore a -20°C (da -15°C a -24°C) fino alla data di scadenza.

Tampone per campione A: Un flacone 10,0 mL

Tampone con albumina di siero bovino (BSA), siero animale (capra, topo), tensioattivo e sodio azide.

Conservare a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Tampone per campione B: Un flacone 10,0 mL

Tampone con < 20% di perossido di idrogeno urea, < 0,5% ProClin 300 e sodio azide.

Conservare a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Soluzione cromogena TMB: Un flacone 11,0 mL

Tetrametilbenzidina (TMB) in tampone citrato con perossido di idrogeno.

Conservare a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Soluzione di arresto A: Un flacone 11,0 mL

0,2 M acido solforico.

Conservare a 2–8°C o a temperatura ambiente (18–25°C) fino alla data di scadenza.

Diluente del coniugato: Un flacone 15,0 mL

Tampone con BSA, siero animale (capra, topo), tensioattivo e < 1,0% ProClin 300.

Conservare a 2–8°C fino alla data di scadenza.

Concentrato di lavaggio U (20X): Un flacone 50,0 mL

Soluzione concentrata da diluire prima dell'uso.

Conservare a 2–8°C o a temperatura ambiente (18–25°C) fino alla data di scadenza.

Kit per il dosaggio del Inhibin A: 384 pozzetti (Cat. #DSL-10-28100T-4)

Micropiastra rivestita (strisce) Anti-Inhibin A: Quattro portastrisce, ognuno contenente 96 pozzetti di microtitolazione.

Concentrato di coniugato Inhibin A: Quattro fiale 0,6 mL

Calibratori: due set (dodici fiale) 1,0 mL e due fiale 2,0 mL di calibratore zero (pronti per l'uso)

Controllo: Due set (quattro fiale) 1,0 mL (pronti per l'uso)

Tampone per campione A: quattro flaconi 10,0 mL

Tampone per campione B: tre flacone 10,0 mL

Soluzione cromogena TMB: Un flacone 50,0 mL

Soluzione di arresto A: quattro flaconi 11,0 mL

Diluente del coniugato: Quattro flaconi 15,0 mL

Soluzione di lavaggio (20x): Due flaconi 50 mL

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Oltre alla normale attrezzatura da laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

- Lettore di micropiastre in grado di misurare l'assorbanza a 450 nm e preferibilmente con possibilità di lettura a doppia lunghezza d'onda tra 600 e 630 nm
- Acqua deionizzata
- Micropipette di precisione per dispensare 50–100 µL
- Agitatore orbitale di micropiastre 500–700 rpm
- Dispositivo per il lavaggio delle micropiastre
- Miscelatore vortex
- Materiali assorbenti per asciugare le strisce
- Carta millimetrata per il calcolo manuale dei risultati

PROCEDURA

Note sulla procedura

- È necessaria la piena comprensione di queste istruzioni allegate alla confezione per un uso corretto di Inhibin A ELISA.
- È responsabilità del cliente convalidare il test per l'uso.
- È possibile ottenere risultati affidabili solo impiegando tecniche di laboratorio precise e seguendo con attenzione le istruzioni allegate alla confezione.
- Inserire la curva standard in ogni esperimento.
- Portare tutti i reagenti del kit a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.
- Miscelare accuratamente i reagenti prima dell'uso, capovolgendoli delicatamente.
- Non mischiare componenti del kit di lotti diversi nel corso della stessa analisi.
- Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Un lavaggio incompleto condiziona negativamente l'esito e la precisione dell'analisi.
- Per ridurre al minimo la potenziale deviazione dell'analisi dovuta alla variazione del tempo di incubazione del substrato, è importante aggiungere la soluzione di arresto nei pozzetti secondo lo stesso ordine e velocità impiegati per aggiungere la soluzione cromogena TMB.
- Manipolare tutti i reagenti attentamente per evitare l'introduzione di contaminanti microbici che possono danneggiare i reagenti, in particolar modo il Diluente coniugato e il Sample Buffer A.
- Evitare la contaminazione della soluzione cromogena TMB con i coniugati.
- Utilizzare puntali puliti e monouso per ciascun reagente, calibratore, controllo o campione.
- Per l'erogazione di acido solforico e della soluzione cromogena TMB, non utilizzare pipette con parti metalliche.
- L'enzima utilizzato come marcatore viene inattivato dall'ossigeno ed è altamente sensibile a contaminazione microbica, sodio azide, acido ipocloroso e cloridrocaburi aromatici spesso presenti nell'acqua impiegata in laboratorio.
- Utilizzare acqua deionizzata.
- Evitare l'esposizione dei reagenti a calore eccessivo o alla luce solare diretta durante la conservazione e l'incubazione.

Preparazione dei reattivi

1. **Soluzione di lavaggio:** versare il contenuto della fiala in 950 mL di acqua distillata e omogeneizzare. La soluzione diluita può essere conservata per un mese a 18–25 °C o fino alla data di scadenza del kit a 2–8 °C.
2. **Soluzione coniugato enzima/anticorpo Inhibin A:** Diluire il concentrato coniugato enzima-anticorpo Inhibin A in rapporto 1:50 con il Diluente del Coniugato Inhibin A, in base al numero di pozzetti utilizzati. Per una piastra completa, pipettare esattamente 220 µL del concentrato coniugato anticorpo/enzima Inhibin A in 11 mL di Diluente del coniugato.
NOTA: Diluire il coniugato enzima/anticorpo Inhibin A concentrato 10–15 minuti prima dell'uso.
3. **Pozzetti di microtitolazione:** Selezionare il numero di pozzetti sensibilizzati richiesti per l'analisi. Riposizionare i restanti pozzetti inutilizzati confezione risigillabile con l'essiccante. Risigillare la confezione per proteggerla dall'umidità.

Schema del dosaggio

Lasciare che campioni e reagenti raggiungano la temperatura ambiente (18-25°C). Prima dell'uso, mescolare adeguatamente i reagenti, capovolgendoli delicatamente. Dopo la ricostituzione dei reagenti, mescolare bene, evitando la formazione di schiuma. Dosare calibratori, controlli e campioni in duplicato.

1. Contrassegnare le strisce di microtitolazione da utilizzare.
2. Pipettare 50 µL calibratori, controlli e campioni nei rispettivi pozzetti.
3. Aggiungere 50 µL di Sample Buffer A a ogni pozzetto utilizzando una pipetta di precisione.

4. Aggiungere 50 µL di Sample Buffer B a ogni pozzetto utilizzando una pipetta di precisione.
5. Incubare agitando per tre ore a temperatura ambiente (18-25°C) a 500–700 rpm su un agitatore orbitale per micropiastre.
6. Preparare la soluzione coniugato anticorpo-enzima diluendo il concentrato coniugato anticorpo-enzima nel Diluente del coniugato Inhibin A come descritto nella sezione "Preparazione dei reagenti" di questo foglietto illustrativo.
7. Aspirare e lavare ogni pozzetto sei volte con la soluzione di lavaggio utilizzando un dispositivo di lavaggio per micropiastre automatico o manualmente utilizzando una pipetta di precisione. Tamponare e asciugare, capovolgendo la piastra su materiale assorbente.

NOTA: È fortemente consigliato l'utilizzo di un dispositivo automatico per il lavaggio delle micropiastre. Il lavaggio incompleto condiziona negativamente la precisione dell'analisi. Se non fosse disponibile un dispositivo di lavaggio per micropiastre, seguire le seguenti istruzioni per lavare la piastra manualmente.

(a) Aspirare completamente il liquido da ogni pozzetto

(b) Dispensare 350 µL della soluzione di lavaggio in ogni pozzetto utilizzando una pipetta di precisione

(c) Aspirare nuovamente il liquido

(d) Ripetere i passaggi (b) e (c) cinque volte

8. Aggiungere 100 µL di soluzione coniugato enzima-anticorpo a tutti i pozzetti utilizzando una pipetta di precisione.
9. Incubare agitando a 500–700 rpm su un agitatore orbitale per micropiastre per un'ora a temperatura ambiente (18-25°C).
10. Aspirare e lavare ogni pozzetto sei volte con la soluzione di lavaggio utilizzando un dispositivo di lavaggio per micropiastre automatico. Tamponare e asciugare, capovolgendo la piastra su materiale assorbente.
11. Aggiungere 100 µL di soluzione di cromogeno TMB a tutti i pozzetti utilizzando una pipetta di precisione.

Evitare l'esposizione alla luce diretta.

12. Incubare i pozzetti, agitando a 500–700 rpm su un agitatore orbitale per micropiastre per 15 minuti a temperatura ambiente (18-25°C).

NOTA: Il colore può svilupparsi più velocemente o più lentamente del tempo di incubazione consigliato in base alla temperatura della stanza. Monitorare visivamente lo sviluppo del colore per ottimizzare il tempo di incubazione.

13. Aggiungere 100 µL della soluzione di arresto in ogni pozzetto.

14. Leggere i valori dell'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 30 minuti, utilizzando un lettore di micropiastre impostato su 450 nm.

NOTA:

1) Durante la lettura dell'assorbanza nei pozzetti di microtitolazione è necessario programmare lo calibratore zero come "Bianco".

2) Se è disponibile la correzione della lunghezza d'onda, impostare lo strumento per la misura a doppia lunghezza d'onda a 450 nm con una correzione della lunghezza d'onda del rumore di fondo impostata tra 600 e 630 nm.

RISULTATI

1. Calcolare l'assorbanza media per ogni calibratore, controllo o campione.
2. Tracciare la curva di taratura in scala lin-log ponendo sull'asse delle ordinate (asse delle y) le assorbanze degli calibrador e sull'asse delle ascisse (asse delle x) le rispettive concentrazioni di inibina A in pg/mL con l'elaborazione lineare. In alternativa, i dati possono essere tracciati lineare vs. lineare ed è possibile utilizzare un adattamento a spline arrotondato.
3. Rappresentare la curva con il "best fit" utilizzando la media dei punti de i duplicati.
4. Determinare le concentrazioni di inibina A dei controlli e dei campioni dalla curva standard facendo corrispondere le letture medie dell'assorbanza con le concentrazioni di inibina A corrispondenti.
5. Diluire opportunamente tutti i campioni le cui letture risultano essere superiori allo calibratore più alto utilizzando lo calibratore 0 dell'Inhibin A e rianalizzarli.

6. Tutti i campioni con valori inferiori alla sensibilità analitica devono essere riportati come tali.
7. Se necessario, moltiplicare il valore per un fattore di diluizione.

NOTA: Se i valori di assorbanza superano i limiti del lettore di piastre, è necessario eseguire una seconda lettura a 405 nm (con filtro di riferimento a 600–630 nm, se disponibile). In questo caso, procedere a costruire una seconda curva standard come in precedenza con le letture dell'assorbanza di tutti gli calibratore a 405 nm. La concentrazione dei campioni fuori scala a 450 nm è quindi letta dalla nuova curva standard. I valori rilevati a 405 nm non devono sostituire i valori che rientrano nell'intervallo a 450 nm.

Curva standard

Calibratori	Conc. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (bianco)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Esempio di curva standard. Non usare per calcolare il valore dei propri campioni)

Campioni

Per convertire da IU/mL, usare l'equazione seguente:

$$1 \text{ IU/mL (OMS 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

VALORI ATTESI

Ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento, per stabilire una corretta rappresentazione delle popolazioni specifiche. I valori seguenti presentati sono stati ottenuti con Inhibin A ELISA usando campioni di siero da adulti sani apparentemente normali. Tutti i valori sono riportati in pg/mL. Per donne con cicli normali, i numeri al di sotto di ciascuna fase rappresentano i giorni prima o dopo un picco di LH.

Popolazione	n	Mean	Media	Intervallo di Confidenza 95%
Donne con cicli normali				
Fase follicolare iniziale (da -14 a -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Follicolare media (da -9 a -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Follicolare finale (da -3 a -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Ciclo medio (Giorno 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Luteale iniziale (da 1 a 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Luteale medio (da 4 a 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Luteale finale (da 12 a 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Livelli di picco IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1.690
PCOS - Ovulatorio	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Postmenopausa	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Uomini normali	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Sono estrapolati i valori dell'inibina A inferiori al Calibratore 1.

I valori rappresentati nella tabella seguente sono inibina A in siero materno nel secondo trimestre.

Settimana Completa	campioni	Inhibina A Mediana (pg/mL)	LOG ₁₀ DS
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabella adattata da valori forniti da un centro di screening statunitense (2005).

CONTROLLO DI QUALITÀ

- I controlli Inhibin A ELISA o altri controlli disponibili in commercio devono rientrare nei limiti di confidenza stabiliti.

- I limiti di confidenza dei controlli Inhibin A ELISA sono stampati sul foglio del controllo di qualità.
- Per ogni sessione di dosaggio includere sempre una curva standard completa, compresi i controlli dei livelli bassi e alti.
- La soluzione cromogena TMB deve essere da trasparente a giallo molto chiaro. Lo sviluppo di un colore blu può indicare contaminazione o instabilità del reagente.
- I controlli di qualità sono costituiti da una matrice compatibile con la matrice dei campioni dei pazienti; la loro determinazione è essenziale per la verifica delle prestazioni del dosaggio. Includere CQ o altre matrici di controllo qualità disponibili in commercio che coprano almeno due livelli di analita. Un utilizzo più frequente dei controlli o l'utilizzo di controlli aggiuntivi è a discrezione dell'utente in base alle regole della buona pratica di laboratorio o ai requisiti di accreditamento del laboratorio e alle leggi vigenti in materia. Seguire le istruzioni del produttore per la ricostituzione e la conservazione. Ogni laboratorio deve stabilire i propri valori medi e i propri intervalli di accettabilità. I risultati dei sieri di controllo qualità all'esterno dell'intervallo di accettabilità indicano che i risultati forniti dal kit potrebbero non essere corretti.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

(Ulteriori dati sono riportati in "APPENDIX")

Vengono forniti dati rappresentativi a mero scopo illustrativo. I risultati possono variare da laboratorio a laboratorio.

Sensibilità

Limite rilevazione (LoD): 2,61 pg/mL

Specificità

L'anticorpo utilizzato nel dosaggio immunometrico è altamente specifico per l'inibina A.

Precisione

Intra-saggio

Alcuni campioni sono stati dosati 25 volte in uno stesso esperimento. Per i campioni di siero è stato trovato un coefficiente di variazione del 4,6% o inferiore.

Inter-saggio

I campioni sono stati analizzati in doppio in 10 diverse serie. I coefficienti di variazione erano minori o uguali a 6,9% per i campioni di siero.

Accuratezza

Test di diluizione

Alcuni campioni ad alta concentrazione sono stati diluiti con diluizioni seriali con il calibratore zero. Il recupero è risultato essere compreso tra 97,8% e 117%.

Test di recupero

I campioni a bassa concentrazione sono stati corretti con quantità note di Inibina A. Le percentuali di recupero ottenute sono comprese tra 83,5% e 99,5%.

Intervallo di misurazione (da Limite rilevazione a valore massimo calibratore): da 2,61 a circa 1.000 pg/mL.

LIMITAZIONI

- I reagenti forniti in questo kit sono ottimizzati per misurare i livelli di inibina A in siero o plasma.
- Per le analisi che impiegano anticorpi, è possibile la comparsa di interferenza nel campione da parte di anticorpi eterofili. I campioni di soggetti che sono stati esposti periodicamente ad animali o sottoposti a immunoterapia o procedure diagnostiche che utilizzano immunoglobuline o frammenti immunoglobulinici possono produrre anticorpi, ad esempio HAMA, che interferiscono con gli immunodosaggi. Inoltre, nei campioni possono essere presenti altri anticorpi eterofili, come ad esempio gli anticorpi umani anti-capra.^{22, 23} Tali anticorpi interferenti possono causare risultati erronei. Valutare attentamente i risultati dei pazienti sospettati di avere questi anticorpi.
- Se si rilevano segni di contaminazione microbica o torbidità eccessiva in un reagente, scartare il flaconcino.
- I risultati del kit Inhibin A ELISA devono essere valutati assieme agli altri dati di laboratorio o strumentali e ai segni clinici del paziente.

La decisione finale sul trattamento deve tenere conto di tutti i dati disponibili.



INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

SOLO PARA USO PROFESIONAL,

El kit de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) Inhibin A proporciona materiales para la medición cuantitativa de la inhibina A dimérica en el suero o plasma humano. Este kit está destinado únicamente para uso *in vitro* y como ayuda al diagnóstico y el control de varios trastornos reproductores hormonales. La detección sistemática del síndrome de Down (Trisomía 21) en el 2º trimestre por medio de marcadores bioquímicos y ultrasónicos combinados puede evaluarse con los algoritmos adecuados que pueden procesarse en software comercial de cálculo de riesgos.^{24, 25} Se recomienda encarecidamente utilizar software validado (con la marca CE) diseñado específicamente para evaluar el riesgo de trisomía 21, ej.: software alpha.* El kit Inhibin A está concebido para utilizarse en conjunción con hAFP + hCG + uE3.

RESUMEN

Las inhibinas son hormonas de proteínas heterodiméricas secretadas por células de granulosa del ovario en la mujer y por las células de Sertoli en los testículos en el hombre. Suprimen selectivamente la secreción de folitropina (FSH) y también tienen acciones paracrinas locales en las gónadas.^{1, 2}

La forma enteramente tratada de la molécula de inhibina tiene un peso molecular de aproximadamente 32 kD y consta de dos cadenas distintas (α y β), ligadas por enlaces bisulfuro. Los formas de mayor peso molecular, con formas precursoras de la subunidad α , también se dan en el líquido folicular y el suero. Además, también hay presentes formas libres de la subunidad α , no asociadas a la subunidad β , y sin bioactividad de inhibina.^{3, 4, 5, 6}

Inhibin A se compone de: subunidad α y subunidad β_A . Las medidas de la inhibina A resultan útiles para estudiar su función en la fisiología reproductora humana.^{7, 8, 9} Varios estudios publicados indican la utilidad de la medición de la inhibina A como marcador endocrino para el control de la función ovárica.^{10, 11, 12, 13, 14, 16, 17} Hasta hace poco, no era posible distinguir entre la inhibina dimérica funcional en circulación y la subunidad α libre en el ciclo menstrual humano normal.

Sin embargo, con el uso de pares altamente caracterizados de anticuerpos, se ha observado que el ELISA "sandwich" doble puede medir específicamente la inhibina A dimérica.¹⁸

PRINCIPIO

El Inhibin A ELISA es un análisis tipo "sandwich" de dos fases amplificado enzimáticamente. En el análisis, los calibradores, controles y muestras se incuban en pocillos de microplaca con un revestimiento de anticuerpos de subunidad β_A anti-inhibina. Tras la incubación y el lavado, a cada pocillo se agregan anticuerpos de detección de subunidad alfa anti-inhibina marcados con peroxidasa de rábano (HRP). Después de una segunda incubación y lavado, se agrega sustrato tetrametilbenzidina (TMB) en los pocillos.

Por último, se agrega una solución ácida de bloqueo. El grado de coloración ("turnover") enzimático del sustrato se determina mediante una medición de la absorbancia de longitud de onda doble a 450 nm y entre 600 y 630 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de inhibina A en las muestras. Un conjunto de calibradores de Inhibin A se utilizan para trazar una curva de patrones de la absorbancia en relación con la concentración de inhibina A. Las concentraciones de inhibina A de las muestras podrán calcularse a partir de esta curva de patrones.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

Adopte buenas prácticas de laboratorio.¹⁹

Las muestras y los productos hemoderivados pueden procesarse rutinariamente con un riesgo mínimo siguiendo el procedimiento que se describe. Sin embargo, debe manipular estos productos como potencialmente infecciosos según las precauciones universales y las prácticas de laboratorio adecuadas, independientemente de su origen, tratamiento o certificación anterior.²⁰ Utilice un desinfectante adecuado para la descontaminación. Guarde y deseche estos materiales y sus pocillos en conformidad con la normativa y las directrices locales.

CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

Calibrators / Controls ATENCIÓN



H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.
H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
P273	No dispersar en el medio ambiente.
P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.
P333+P313	En caso de irritación cutánea o sarpullido: consulte a un médico.
P362+P364	Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de usarla. masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) <0,05 %

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate ATENCIÓN









H316	Provoca irritación cutánea leve.
H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.
H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
P273	No dispersar en el medio ambiente.
P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.
P332+P313	En caso de irritación cutánea: consultar a un médico.
P333+P313	En caso de irritación cutánea o sarpullido: consulte a un médico.
P362+P364	Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de usarla. Acido 3-(N-Morfolino)-2-hidroxi propano sulfónico, sal sódica 1 - 2 % masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) <0,05 %

Sample Buffer A PELIGRO



H316	Provoca irritación cutánea leve.
H318	Provoca lesiones oculares graves.

	P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.		H316	Provoca irritación cutánea leve.
	P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.		H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.
	P310	Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.		H318	Provoca lesiones oculares graves.
	P332+P313	En caso de irritación cutánea: consultar a un médico. Sulfato de docecilo, sal sódica 1 - < 3 % Tris(hidroximetil)-aminomethane (aminometano) 1 - 2 % Alcohol, C12-14 secundario, etoxilado 3 - 5 %		H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Sample Buffer B	PELIGRO			P273	No dispersar en el medio ambiente.
				P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.
				P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
	H314	Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares.		P310	Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.
	H317	Puede provocar una reacción cutánea alérgica.		P333+P313	En caso de irritación cutánea o sarpullido: consulte a un médico.
	P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.		P362+P364	Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de usarla. Tris(hidroximetil)-aminomethane (aminometano) 1 - 3 % Alcohol, C12-14 secundario, etoxilado 3 - 5 % masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) < 0,05 %
	P303+P361+P353	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Enjuagar la piel con agua.			
	P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.	Solución de parada A	PELIGRO	
	P310	Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.			
	P333+P313	En caso de irritación cutánea o sarpullido: consulte a un médico.		H314	Provoca graves quemaduras en la piel y lesiones oculares.
	P362+P364	Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de usarla. Hidrógeno peróxido urea 10 - 20 % masa de reacción de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) < 0,05 %		P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.
Conjugate Diluent	PELIGRO			P301+P330+P331	EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.
				P303+P361+P353	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Enjuagar la piel con agua.
				P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
				P310	Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Acido sulfúrico 1 - 3 %
			Wash solution (20x)	PELIGRO	
					

H360	Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.
P201	Procurarse las instrucciones antes del uso.
P280	Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.
P308+P313	EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico. Ácido bórico 0,1 - 0,3 % Sodio tetraborato decahidrato 0,1 - 0,3 %

SDS La hoja de datos de seguridad está disponible en beckmancoulter.com/techdocs

RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO, ALMACENAMIENTO Y DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

El suero y el plasma son las muestras recomendadas.

Observe las recomendaciones siguientes para la manipulación, el procesamiento y el almacenamiento de las muestras sanguíneas:²¹

- Recoger todas las muestras de sangre observando las precauciones habituales de la venopunción.
- Mantener las probetas cerradas en todo momento.
- Antes de dos horas transcurrido el centrifugado, transfiera al menos 500 µL de muestra sin células en un tubo de almacenamiento. Tapone bien el tubo inmediatamente.
- Guarde las muestras sin diluir y diluidas bien taponadas entre 2 y 8°C durante un máximo de 24 horas.
- Si no se va a realizar el análisis antes de 24 horas, ni se van a enviar las muestras, congele a una temperatura de -20°C o más fría durante un máximo de 30 días.

Observe las directrices siguientes cuando prepare las muestras:

- Antes de realizar el análisis asegurarse de que se han eliminado la fibrina residual y el material celular.
- Siga las recomendaciones de centrifugado del fabricante de tubos de recogida de muestras de sangre.

Cada laboratorio deberá determinar la validez de sus propios tubos de recogida de muestras de sangre y de sus productos para separación de suero. Pueden existir diferencias en estos productos entre diferentes fabricantes y, en ocasiones, entre distintos lotes.

Evite congelar y descongelar las muestras varias veces.

Evitar el análisis de muestras lipémicas, ictericas o hemolizadas.

MATERIALES PROPORCIONADOS

Equipo para la determinación de Inhibin A: 96 pocillos (ref. #DSL-10-28100T-1)

Tiras de microplaca revestidas de anticuerpos Anti-Inhibin A: Uno soporte de tiras, con 96 pocillos de microplaca.

Pocillos de microplaca de poliestireno con anti-inhibina β_A inmovilizado en la pared interior de cada pocillo.

Almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad en la bolsa desechable con un desecante para proteger contra la humedad.

Concentrado de conjugado anticuerpo-enzima de Inhibin A: uno vial de 0,6 mL

Conjugado de anticuerpo de subunidad α de anti-inhibina monoclonal de ratón / HRP, MOPSO, BSA y < 1,0 % de ProClin** 300.

Almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Diluir antes del uso en diluyente de conjugado.

Estándar: Seis viales de 1,0 mL y uno vial de 2,0 mL vial de "cero" (listo para su uso)

Concentraciones de aproximadamente 0, 10, 30, 100, 250, 500 y 1000 pg/mL de inhibina A dimérica recombinante en suero bovino con <0,5% de ProClin 300.

Consulte las etiquetas de los viales para conocer la concentración exacta.

Almacenar sin abrir entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Estable entre 2 y 8°C durante 28 días después del uso inicial. En el caso de periodos más prolongados, debe almacenarse en un congelador a -20°C (entre -15°C y -24°C) hasta la fecha de caducidad.

La medida (análito) de los calibradores de Inhibin A es certificable por el Patrón Internacional para Inhibin-A de la Organización Mundial de la Salud (código 91/624) que contiene inhibina A humana recombinante 32 kDa (1 pg/mL ó 0,037 UI/mL). Los valores asignados se establecieron utilizando muestras representativas de este lote de calibradores, y son específicos de los métodos de análisis de los reactivos. Es posible que los valores asignados por otros métodos sean diferentes. Estas diferencias, si existen, pueden ser debidas a errores sistemáticos de los métodos.

Controles: dos viales de 1,0 mL (listo para usar)

Concentraciones bajas y altas de inhibina A dimérica recombinante en suero bovino con < 0,5 % de ProClin 300.

Los valores esperados se encuentran en el rango de concentración indicado en la hoja suplemento.

Almacenar sin abrir entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Estable entre 2 y 8°C durante 28 días después del uso inicial. En el caso de periodos más prolongados, debe almacenarse en un congelador a -20°C (entre -15°C y -24°C) hasta la fecha de caducidad.

Tampón de muestra A: uno frasco de 10,0 mL

Tampón de albúmina sérica bovina (BSA), suero animal (cabra, ratón), surfactante y azida sódica.

Almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Tampón de muestra B: uno frasco de 10,0 mL

Tampón de < 20 % urea-peróxido de hidrógeno, < 0,5 % de ProClin 300 y azida sódica.

Almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Solución de cromógeno TMB: uno frasco 11,0 mL

Tetrametilbenzidina (TMB) en tampón citrato con peróxido de hidrógeno.

Almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Solución de Detención A: uno frasco 11,0 mL

0,2 M de ácido sulfúrico.

Almacenar entre 2 y 8 °C o a temperatura ambiente (18-25 °C) hasta la fecha de caducidad.

Diluyente de conjugado: uno frasco 15,0 mL

Tampón de albúmina sérica bovina (BSA), suero animal (cabra, ratón), surfactante y < 1,0 % de ProClin 300.

Almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.

Concentrado de lavado U (20X): Uno frasco de 50,0 mL

La solución concentrada debe diluirse antes de su uso.

Almacenar entre 2 y 8 °C o a temperatura ambiente (18-25 °C) hasta la fecha de caducidad.

Equipo para la determinación de Inhibin A: 384 pocillos (ref. #DSL-10-28100T-4)

Tiras de microplaca revestidas de anticuerpos Anti-Inhibin A: Cuatro soportes de tiras, cada uno contiene 96 pocillos de microtitulación.

Concentrado de conjugado anticuerpo-enzima de Inhibin A: Cuatro viales de 0,6 mL

Estándar: Dos juegos (doce viales) de 1,0 mL y dos viales de 2,0 mL de "cero" (listo para usar)

Controles: Dos juegos (cuatro viales) de 1,0 mL (listo para usar)

Tampón de muestra A: Cuatro frascos de 10,0 mL

Tampón de muestra B: tres frascos 10,0 mL

Solución de cromógeno TMB: Un frasco de 50,0 mL

Solución de Detención A: cuatro frascos de 11,0 mL

Diluyente de conjugado: cuatro frascos de 15,0 mL

Solución de lavado (20x): 2 frascos de 50 mL

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

Además del equipo normal de laboratorio se requiere lo siguiente:

- Lector de microplacas para la medición de la absorbencia a 450 nm y preferentemente con capacidad de corrección de longitud de onda doble de 600 y 630 nm
- Agua desionizada
- Pipeta de precisión para suministrar 50–100 µL
- Agitador de microplacas con una capacidad de 500–700 revoluciones orbitales por minuto (rpm)
- Lavador de microplacas
- Mezclador de tipo vortex
- Materiales absorbentes para secar las tiras
- Papel gráfico para la reducción de datos manual

PROCEDIMIENTO

Notas sobre procedimientos

- Es necesario comprender totalmente la información de este prospecto para utilizar correctamente Inhibin A ELISA.
- El usuario es responsable de validar el uso del análisis.
- Únicamente se obtendrán resultados de laboratorio fiables si se utilizan técnicas de laboratorio precisas y se sigue con exactitud la información del prospecto.
- Incluir una curva estandar en cada ensayo.
- Ponga todos los reactivos del kit a temperatura ambiente (18-25°C) antes del uso.
- Mezcle totalmente los reactivos antes del uso invirtiéndolos ligeramente.
- No mezcle lotes distintos de ningún componente del kit en un análisis individual.
- No utilice ningún componente después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.
- El lavado incompleto afectará adversamente al resultado y la precisión del análisis.
- Para reducir al mínimo la desviación potencial debido a la variación en el tiempo de incubación del sustrato, es necesario actuar con precaución para agregar la solución de bloqueo en los pocillos en el mismo orden y velocidad usados para agregar la solución de cromógeno TMB.
- Manipule con cuidado todos los reactivos para evitar la entrada de contaminantes microbianos que puedan dañar los reactivos, en especial el Diluyente de conjugado y el Tampón para muestras A.
- Evite la contaminación de la solución de cromógeno TMB con los conjugados.
- Utilice una punta de pipeta desechable para cada reactivo, calibrador, control o muestra.
- Para dispensar el ácido sulfúrico y la solución de cromógeno TMB, evite utilizar pipetas con las piezas metálicas.
- La enzima usada como la etiqueta está inactivada por oxígeno, y es altamente sensible a la contaminación microbiana, a la azida sódica, al ácido hipocloroso y a los clorohidrocarburos aromáticos que existen a menudo en los suministros de agua de laboratorio.
- Utilice agua desionizada.
- Evite exponer el reactivo al calor excesivo o la luz solar directa durante el almacenamiento y la incubación.

Preparación de los reactivos

1. **Solución de lavado:** Verter el contenido del vial en 950 mL de agua destilada y homogeneizar. La solución diluida se puede almacenar a 18-25 °C un mes o a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
2. **Solución de conjugado de anticuerpo-enzima de Inhibin A:** El concentrado de conjugado de anticuerpo-enzima de Inhibin A debe diluirse a una relación de 1 parte en 50 partes de diluyente

de conjugado de Inhibin A, según el número de pocillos utilizados. Para toda la placa, pipetee exactamente 220 µL del concentrado de conjugado de anticuerpo-enzima de Inhibin A en 11 mL del diluyente del conjugado.

NOTA: El concentrado del conjugado de anticuerpo-enzima de Inhibin A debe diluirse 10–15 minutos antes del uso.

3. **Pocillos de microplaca:** Seleccione el número de pocillos con revestimiento para el análisis. Los pocillos restantes no utilizados deben colocarse en la bolsa con cierre con un desecante. La bolsa debe cerrarse herméticamente para protegerla de la humedad.

Procedimiento del ensayo

Ponga todas las muestras y los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C). Mezcle totalmente los reactivos antes del uso invirtiéndolos ligeramente. Tras reconstituir los reactivos, mézclelos totalmente y evite la formación de espuma. Los calibradores, controles y muestras deben analizarse por duplicado.

1. Marque las tiras de microplaca que se vayan a utilizar.
2. Pipetee 50 µL de los calibradores, controles y muestras en los pocillos adecuados.
3. Añada 50 mL del tampón de análisis de muestra A en cada pocillo utilizando una pipeta de precisión.
4. Añada 50 mL del tampón de análisis de muestra B en cada pocillo utilizando una pipeta de precisión.
5. Incube los pocillos, agitando a 500–700 rpm en un agitador de microplacas orbital durante tres horas a temperatura ambiente (18-25°C).
6. Prepare la solución de conjugado anticuerpo-enzima diluyendo el concentrado del conjugado anticuerpo-enzima en el diluyente del conjugado de Inhibin A, según se indica en la sección "Preparación de los reactivos" de este prospecto.
7. Aspire y lave cada pocillo seis veces durante 30 segundos con la solución de lavado utilizando un lavador de microplacas automático o manualmente con una pipeta de aspiración. Invierta la placa sobre material absorbente para secar.

NOTA: Es muy recomendable utilizar un lavador de microplacas automático. El lavado incompleto afectará adversamente a la precisión del análisis. Si no es posible utilizar un lavador de microplacas, siga estos pasos para lavar manualmente la placa:

(a) *Aspire completamente el líquido de cada pocillo*

(b) *Añada 350 µL de solución de lavado en cada pocillo utilizando una pipeta de precisión.*

(c) *Aspire de nuevo el líquido*

(d) *Repita los pasos (b) y (c) cinco veces*

8. Añada 100 µL de la solución de conjugado anticuerpo-enzima en cada pocillo utilizando una pipeta de precisión.
9. Incube los pocillos, agitando a 500–700 rpm en un agitador de microplacas orbital durante una hora a temperatura ambiente (18-25°C).
10. Aspire y lave cada pocillo seis veces con la solución de lavado utilizando un lavador de microplacas automático. Invierta la placa sobre material absorbente para secar.
11. Añada 100 µL de solución de cromógeno TMB en cada pocillo utilizando una pipeta de precisión.

Evite la exposición a la luz solar directa.

12. Incube los pocillos, agitando a 500–700 rpm en un agitador de microplacas orbital durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

NOTA: Tenga en cuenta que el color puede aparecer más rápido o más lento que el tiempo de incubación recomendado según la temperatura de la sala. Compruebe visualmente la evolución del color para optimizar el tiempo de incubación.

13. Añada 100 µL de solución de bloqueo en cada pocillo utilizando una pipeta de precisión.
14. Lea la absorbancia de la solución en los pocillos en 30 minutos con un lector de microplacas establecido en 450 nm.

NOTA:

1) Mientras se lee la absorbencia del pocillo de la microplaca, es necesario programar el calibrador de cero como "Blank" (Blanco).

2) Si está disponible la corrección de longitud de onda, fije el instrumento en una medición de longitud de onda dual a 450 nm con una corrección de fondo de la longitud de onda establecida entre 600 y 630 nm.

RESULTADOS

1. Calcule la absorbencia media de cada calibrador, control o muestra.
2. Trace el registro de las lecturas de absorbencia media para cada uno de los calibradores a lo largo del eje Y en relación con las concentraciones de inhibina A en pg/mL a lo largo del eje X, utilizando un ajuste de curva lineal. De forma alternativa, los datos pueden trazarse comparando valores lineales, y puede utilizarse un ajuste de curva suavizado.
3. Dibuje la curva mejor trazada con la media de los puntos duplicados.
4. Determine las concentraciones de inhibina A de los controles y las muestras a partir de la curva de Estándar relacionando sus lecturas de absorbencia media con las concentraciones correspondientes de inhibina A.
5. Cualquier lectura de muestra mayor que el calibrador más alto debe diluirse adecuadamente con el calibrador 0 de Inhibin A y volver a analizarse.
6. Cualquier lectura de muestra menor que la sensibilidad analítica debe notificarse como tal.
7. Multiplique el valor por un factor de dilución, si procede.

NOTA: Si las lecturas de la absorbencia exceden las limitaciones del lector de placas, es necesario realizar una segunda lectura a 405 nm (filtro de referencia entre 600 y 630 nm si está disponible) En este caso, genere una segunda curva de calibración igual que antes con las lecturas de la absorbencia de todos los calibradores a 405 nm. La concentración de las muestras fuera de escala a 450 nm se leerán a partir de la nueva curva de Estándar. Las lecturas a 405 nm no deben sustituir las lecturas en escala a 450 nm.

Curva estándar

Calibradores	Conc. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Blanco)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Ejemplo de curva estándar, no utilizar para realizar los cálculos)

Muestras

Para convertir desde IU/mL, use la ecuación siguiente:

$$1 \text{ IU/mL (OMS 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

VALORES ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia para garantizar una representación adecuada de las poblaciones específicas. Los valores siguientes presentados se obtuvieron con Inhibin A ELISA utilizando muestras séricas de adultos sanos aparentemente normales. Todos los valores se indican en pg/mL. Para mujeres con ciclo ovulatorio normal, los valores por debajo de cada fase representan los días antes o después del incremento de LH.

Población	n	Media	Mediana	95% De Intervalo De Confianza
Mujeres con ciclo ovulatorio normal				
Fase folicular temprana (-14 a -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Folicular media (-9 a -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Folicular tardía (-3 a -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Ciclo medio (Día 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Fase luteínica temprana (1 a 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Fase luteínica media (4 a 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Fase luteínica tardía (12 a 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Niveles máximos de FIV	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1690
PCOS - Ovulatorio	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Postmenopausia	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Hombres normales	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Se han extrapolado los valores de la inhibina A por debajo del Calibrador 1.

Los valores representados en la tabla siguiente son inhibina A de suero materno en el segundo trimestre.

Semana Completada	N.º de muestras	Mediana Inhibin A (pg/mL)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabla adaptada de valores proporcionados por un centro de detección sistemática de EE. UU. (2005).

CONTROL DE CALIDAD

- Los controles de Inhibin A ELISA u otros controles comerciales deben estar dentro de límites de confianza establecidos.
- Los límites de confianza para los controles de Inhibin A ELISA indicado en la hoja suplemento.
- En cada análisis debe incluirse una curva de patrón completa, con controles de nivel bajo y alto.
- La solución de cromógeno TMB debe ser entre incolora y amarilla muy pálida. El desarrollo de un color azul puede indicar contaminación o inestabilidad del reactivo.
- Los materiales del control de calidad simulan las características de las muestras del paciente, y son esenciales para supervisar el rendimiento del sistema de los análisis inmunoquímicos. Incluya el Control de calidad u otros materiales de control de calidad disponibles en el mercado que contemplen al menos dos niveles de analito. Un uso más frecuente de los controles o el uso de controles adicionales se deja a criterio del usuario en base a las prácticas de laboratorio correctas o los requisitos de acreditación del laboratorio y las leyes aplicables. Siga las instrucciones del fabricante en relación con la reconstitución y el almacenamiento. Cada laboratorio debe establecer valores medios e intervalos aceptables para garantizar un rendimiento adecuado. Los resultados de control de calidad que no están dentro de los intervalos aceptables pueden indicar resultados de prueba no válidos.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

(Ver la hoja "APPENDIX" para más detalles)

Se facilitan datos representativos solo a modo de ejemplo. El rendimiento obtenido en los distintos laboratorios puede variar.

Sensibilidad

Límite de Detección (LD): 2,61 pg/mL

Especificidad

El anticuerpo que se usa en el inmunoanálisis es altamente específico para la inhibina A.

Precisión

Intra- ensayo

Las muestras se evaluaron 25 veces en las mismas series. Los coeficientes de variación fueron \leq a 4,6 % para las muestras de suero.

Inter-análisis

Las muestras se analizaron por duplicado en 10 series diferentes. Los coeficientes de variación fueron inferiores o iguales al 6,9 % para las muestras de suero.

Precisión

Prueba de dilución

Las muestras altamente concentradas se diluyeron serialmente con el calibrador Cero. Los porcentajes recuperados fueron entre 97,8 % y 117 %.

Prueba de recuperación

Se añadieron muestras de baja concentración a cantidades conocidas de inhibina A. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 83,5 % al 99,5 %.

Intervalo de medición (desde el Límite de Detección hasta el calibrador más alto): de 2,61 a aproximadamente 1000 pg/mL.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados en este kit están optimizados para medir los niveles de inhibina A en suero o plasma.

- Para los análisis que emplean anticuerpos, es posible que los anticuerpos heterófilos produzcan interferencia en la muestra. Las muestras de los individuos que han estado en contacto frecuente con animales o han recibido inmunoterapia o procedimientos de diagnóstico que utilizan inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, pueden producir anticuerpos, ej.: HAMA, que interfieren en los inmunoanálisis. Además, otros anticuerpos heterófilos, tales como anticuerpos de anti-cabra humanos, pueden estar presentes en las muestras.^{22, 23} Estos anticuerpos perturbadores pueden producir resultados erróneos. Evalúe detenidamente los resultados de los pacientes que se sospeche que tengan estos anticuerpos.
- Descarte el vial, si hubiera evidencia de contaminación microbiana o una excesiva turbidez en el reactivo.
- Los resultados de Inhibin A ELISA deben interpretarse a la luz de la presentación clínica total del paciente, incluidos: los síntomas, la historia clínica, los datos de pruebas adicionales e información adicional adecuada.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

EXCLUSIVAMENTE PARA FINS PROFISSIONAIS,

O kit de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) Inibina A fornece materiais para a medição quantitativa de inibina A dimérica em plasma ou soro humano. Destina-se estritamente à utilização *in vitro* como um auxiliar no diagnóstico e na monitorização de várias doenças reprodutivas hormonais. O rastreio da síndrome de Down (Trissomia 21) no segundo trimestre utilizando marcadores de ultrassom e bioquímicos combinados pode ser avaliado com os algoritmos adequados, que podem ser executados em software de cálculo de risco comercialmente disponível.^{24,25} Recomenda-se vivamente a utilização de software validado (com marcação CE) especialmente concebido para avaliar o risco de Trissomia 21, por exemplo, software alpha.* O kit de Inibina A destina-se a ser utilizado em combinação com hAFP + hCG + uE3.

RESUMO

As inibinas são hormonas de proteínas heterodiméricas segregadas por células granulosas do ovário na mulher e células de Sertoli dos testículos no homem. Estas suprimem seletivamente a secreção da hormona de estimulação folicular (FSH) da hipófise e também têm ações parácrinas locais nas gónadas.^{1,2}

A forma totalmente processada da molécula de inibina tem um peso molecular de aproximadamente 32 kD e é composta por duas cadeias distintas (α e β), ligadas por pontes de dissulfeto. As formas de peso molecular mais elevado, com formas precursoras da subunidade α também ocorrem em soro e fluido folicular. Além disso, as formas livres da subunidade α , não associadas a uma subunidade β e sem bioatividade de inibina, também estão presentes.^{3,4,5,6}

A Inibina A é composta por uma subunidade α e uma subunidade β_A . As medições de inibina A provaram ser úteis no estudo da sua função na fisiologia reprodutiva humana.^{7,8,9} Vários relatórios publicados indicam a utilidade da medição da inibina A como um marcador endócrino para a monitorização da função ovárica.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Até recentemente, não era possível distinguir entre a inibina dimérica funcional em circulação e a subunidade α livre no ciclo menstrual humano normal.

No entanto, ao utilizar o par de anticorpos altamente caracterizado, revelou-se que a «sanduíche» ELISA de local duplo apenas é capaz de medir especificamente a inibina A dimérica.¹⁸

PRINCÍPIO

O ELISA de Inibina A é um ensaio tipo «sanduíche» de duas fases enzimaticamente amplificado. No ensaio, os calibradores, os controlos e as amostras são incubados em poços de microtitulação que foram revestidos com anticorpos de subunidade β_A de anti-inibina. Após a incubação e lavagem, o anticorpo de deteção da subunidade alfa de anti-inibina rotulado com peroxidase de rábano (HRP) é adicionado a cada poço. Após um segundo passo de incubação e lavagem, o substrato de tetrametilbenzidina (TMB) é adicionado aos poços.

Por último, é adicionada uma solução de paragem ácida. O grau de conversão enzimática do substrato é determinado pela medição da absorvância de comprimento de onda duplo a 450 nm e entre 600 e 630 nm. A absorvância medida é diretamente proporcional à concentração de inibina A nas amostras. É utilizado um conjunto de calibradores de Inibina A para traçar a curva padrão de absorvância versus a concentração de inibina A. As concentrações de inibina A nas amostras podem então ser calculadas a partir desta curva padrão.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Utilize as boas práticas laboratoriais.¹⁹

As amostras e os produtos hemoderivados podem ser regularmente processados com o mínimo de risco seguindo o procedimento descrito. No entanto, manuseie estes produtos como sendo potencialmente infecciosos conforme as precauções universais e boas práticas laboratoriais clínicas, independentemente da sua origem, tratamento ou certificação anterior.²⁰ Utilize um desinfetante apropriado para a descontaminação. Armazene e elimine estes materiais e respetivos recipientes segundo os regulamentos e as normas locais.

CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Calibrators / Controls ATENÇÃO



H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
H412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
P273	Evitar a libertação para o ambiente.
P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a usar. mistura reacional de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) <0,05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate ATENÇÃO









H316	Provoca irritação cutânea ligeira.
H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
H412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
P273	Evitar a libertação para o ambiente.
P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
P332+P313	Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a usar. Ácido 3-(N-Morfolino)-2-hidroxiopropanosulfonato de sódio 1 - 2% mistura reacional de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) <0,05%

Sample Buffer A PERIGO



H316	Provoca irritação cutânea ligeira.
H318	Provoca lesões oculares graves.
P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.

Sample Buffer B	P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.		H316	Provoca irritação cutânea ligeira.
				H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
				H318	Provoca lesões oculares graves.
	P310	Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.		H412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
	P332+P313	Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Laurilsulfato de sódio 1 - < 3% Tris(hidroximetil)-aminomethane (aminometano) 1 - 2% Álcool, C12-14 secundário, etoxilado 3 - 5%		P273	Evitar a libertação para o ambiente.
				P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
				P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
				P310	Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.
				P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
				P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a usar. Tris(hidroximetil)-aminomethane (aminometano) 1 - 3% Álcool, C12-14 secundário, etoxilado 3 - 5% mistura reacional de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 247-500-7] e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona [n.o CE 220-239-6] (3:1) < 0,05%
	PERIGO				
					
					
	H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.		H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
	H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.		P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
	P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.		P303+P361+P353	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): enxaguar a pele com água.
	P303+P361+P353	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): enxaguar a pele com água.		P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
	P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.			
			Solução de Paragem A	PERIGO	
					
				H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
				P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
				P301+P330+P331	EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.
				P303+P361+P353	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): enxaguar a pele com água.
				P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
Conjugate Diluent	PERIGO				
					

	P310	Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Ácido sulfúrico 1 - 3%
Wash solution (20x)	PERIGO	
		
	H360	Pode afetar a fertilidade ou o nascituro.
	P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
	P280	Use luvas de proteção, vestuário de proteção e proteção ocular/proteção facial.
	P308+P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. Ácido bórico 0,1 - 0,3% Borato de sódio decahidratado 0,1 - 0,3%

SDS A Ficha de dados de segurança está disponível em beckmancoulter.com/techdocs

COLHEITA, PROCESSAMENTO, ARMAZENAMENTO, E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

O soro e plasma são as amostras recomendadas.

Siga as recomendações abaixo para manusear, processar e armazenar amostras de sangue:²¹

- Colher todas as amostras de sangue tomando as precauções habituais para a colheita venosa.
- Manter as provetas sempre fechadas.
- Duas horas após a centrifugação, transfira pelo menos 500 µL de amostra sem células para um tubo de amostra de armazenamento. Vede cuidadosamente o tubo de amostra de imediato.
- Armazene amostras diluídas ou não diluídas bem vedadas a 2–8 °C por um período máximo de 24 horas.
- Se o ensaio não for concluído dentro de 24 horas, ou no caso de expedição de amostras, congele a uma temperatura igual ou inferior a –20 °C durante até 30 dias.

Siga as seguintes instruções na preparação das amostras:

- Certificar-se de que a fibrina e a matéria celular residuais tenham sido removidas antes da análise.
- Para a centrifugação, siga as instruções do fabricante dos tubos de amostra de colheita de sangue.

Cada laboratório deve determinar a aceitabilidade das próprias provetas de colheita de sangue e dos produtos de separação do soro. Estes produtos podem variar entre fabricantes diferentes e, às vezes, de um lote para o outro.

Evite ciclos de congelamento e descongelamento repetidos das amostras..

Evitar a análise de amostras lipémicas, ictéricas ou hemolisadas.

MATERIAIS FORNECIDOS

Kit para a determinação de Inibina A: 96 poços (Cat. n.º DSL-10-28100T-1)

Tiras de microtitulação revestidas de anticorpos de anti-inibina A: Um suporte de tiras, com 96 poços de microtitulação.

Poços de microtitulação de poliestireno com anti-inibina β_A imobilizada na parede interior de cada poço.

Armazenar entre 2 a 8°C antes da data de expiração, na embalagem original com um dessecante para proteger da humidade.

Concentrado conjugado de anticorpo-enzima Inibina A: um recipiente de 0,6 mL

Conjugado HRP de anticorpo de subunidade α anti-inibina monoclonal de rato, MOPSO, BSA e < 1,0% de ProClin** 300.

Armazenar entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Dilua antes de utilizar no diluente de conjugado.

Calibradores: Seis recipientes de 1 mL e um recipiente de 2 mL de calibrador «zero» (pronto a utilizar)

Concentrações de aproximadamente 0, 10, 30, 100, 250, 500 e 1000 pg/mL de inibina A dimérica recombinante em soro bovino com < 0,5% de ProClin 300.

Consulte os rótulos dos recipientes para obter as concentrações exatas.

Armazenar fechado entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Estável a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante 28 dias após utilização inicial. Para períodos de tempo mais longos, armazene num congelador a –20 °C (–15 a –24 °C) até à data de validade.

O mensurando (analito) nos calibradores de Inibina A é rastreável em conformidade com a Padrão Internacional da Organização Mundial de Saúde para Inibina A (código 91/624) com inibina A humana 32 kDa recombinante (1 pg/mL ou 0,037 UI/mL). Os valores atribuídos foram estabelecidos utilizando amostras representativas deste lote de padrão, e são específicos das metodologias de ensaio dos reagentes. Os valores atribuídos através de outras metodologias poderão ser diferentes. Estas diferenças, caso existam, poderão ser causadas por tendências entre os métodos.

Controlos: dois recipientes de 1,0 mL (pronto a utilizar)

Concentrações baixas e altas de inibina A dimérica recombinante em soro bovino com < 0,5% de ProClin 300.

Os valores esperados são na gama de concentração indicada num suplemento.

Armazenar fechado entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Estável a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante 28 dias após utilização inicial. Para períodos de tempo mais longos, armazene num congelador a –20 °C (–15 a –24 °C) até à data de validade.

Tampão de amostra A: um frasco de 10,0 mL

Tampão com albumina de soro bovino (BSA), soro animal (cabra, rato), surfatante e azida sódica.

Armazenar entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Tampão de amostra B: um frasco de 10,0 mL

Tampão com < 20% de peróxido de hidrogénio de ureia, < 0,5% de ProClin 300 e azida sódica.

Armazenar entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Solução cromogénica TMB: um frasco de 11,0 mL

Tetrametilbenzidina (TMB) em tampão de citrato com peróxido de hidrogénio.

Armazenar entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Solução A de paragem: um frasco de 11,0 mL

0,2 M de ácido sulfúrico.

Armazenar entre 2 a 8°C ou à temperatura ambiente (18-25°C) até à data de expiração do kit.

Diluente de conjugado: um frasco de 15,0 mL

Tampão com BSA, soro animal (cabra, rato), surfatante e < 1,0% de ProClin 300.

Armazenar entre 2 a 8°C até à data de expiração do kit.

Solução de lavagem U (20x): Um recipiente de 50 mL

Solução concentrada, deve ser diluída antes do uso.

Armazenar entre 2 a 8°C ou à temperatura ambiente (18-25°C) até à data de expiração do kit.

Kit para a determinação de Inibina A: 384 poços (Cat. n.º DSL-10-28100T-4)

Tiras de microtitulação revestidas de anticorpos de anti-inibina A: Quatro suportes de tiras, cada um contendo 96 poços de microtitulação.

Concentrado conjugado de anticorpo-enzima Inibina A: quatro recipientes de 0,6 mL

Calibradores: doze recipientes de 1 mL e dois recipientes de 2 mL de calibrador «zero» (pronto a utilizar)

Soros de controlo: quatro recipientes de 1,0 mL (pronto a utilizar)

Tampão de amostra A: quatro frascos de 10,0 mL

Tampão de amostra B: três frascos de 10,0 mL

Solução cromogénica TMB: um frasco de 50,0 mL

Solução A de paragem: quatro frascos de 11,0 mL

Diluyente de conjugado: quatro frascos de 15,0 mL

Solução de lavagem (20x): dois recipientes de 50 mL

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Em adição ao material usual de laboratório, é ainda necessário:

- Leitor de placas de microtitulação capaz de medir a absorvância a 450 nm e preferencialmente capaz de corrigir o comprimento de onda duplo entre 600 e 630 nm
- Água desionizada
- Pipeta de precisão para dispensar 50–100 µL
- Agitador de placas de microtitulação capaz de 500–700 rotações orbitais por minuto (rpm)
- Lavador de microplacas
- Vórtex
- Material absorvente para secagem das tiras
- Papel gráfico para análise manual dos dados

PROCEDIMENTO

Notas de procedimento

- É necessário um pleno entendimento deste folheto informativo para utilizar o ELISA de Inibina A com sucesso.
- É da responsabilidade do cliente validar o ensaio para a sua utilização.
- Resultados confiáveis somente serão obtidos utilizando técnicas de laboratório precisas e seguindo exactamente o folheto informativo.
- Uma curva padrão deve ser feita em cada ensaio.
- Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar.
- Homogeneizar os reagentes antes do uso por inversão suave.
- Não misture os componentes de kits de lotes diferentes.
- Não utilize qualquer componente para além da data de validade indicada no rótulo.
- Uma lavagem incompleta irá afectar negativamente os resultados e a precisão do ensaio.
- Para minimizar os possíveis desvios no ensaio, devido à variação no tempo de incubação do substrato, deve-se adicionar a solução stop, nos poços da microplaca, na mesma sequência e velocidade utilizadas na adição da solução de cromógeno TMB.
- Manuseie todos os reagentes com cuidado para evitar introduzir contaminantes microbianos que podem danificar os reagentes, especialmente o diluyente de conjugado e o tampão da amostra A.
- Evite a contaminação da solução de cromógeno TMB com o conjugado.
- Use uma ponta descartável e limpa para cada reagente, calibrador, controlo e amostra.
- Para dispensar o ácido sulfúrico e a solução de cromógeno TMB, evite pipetas com partes metálicas.
- A enzima utilizada como marcador é inactivada pelo oxigénio e é altamente sensível à contaminação microbiológica, ázida de sódio,

ácido hipocloroso e cloro frequentemente encontrados em águas fornecidas ao laboratório.

- Use água deionizada.
- Evite a exposição dos reagentes ao calor excessivo ou luz directa durante o armazenamento e incubação.

Preparação dos Reagentes

1. **Solução de lavagem:** deite o conteúdo do frasco em 950 mL de água destilada e homogeneize. A solução diluída pode ser armazenada a 18–25 °C durante um mês ou a 2–8 °C até à data de validade do kit.
2. **Solução conjugada de anticorpo-enzima Inhibin A:** O Concentrado de conjugado anticorpo-enzima Inhibin A deve ser diluído na relação de 1 parte para 50 partes de Diluyente de conjugado Inhibin A, de acordo com o número de poços utilizado. Para um prato inteiro, utilize exactamente 220 µL de Concentrado de conjugado anticorpo-enzima Inhibin A em 11 mL de Diluyente de conjugado.
NOTA: O Concentrado de conjugado anticorpo-enzima Inhibin A deve ser diluído 10 a 15 minutos antes da utilização.
3. **Placas de Microelisa:** Seleccione o número de poços revestidos necessários para o ensaio. Os poços restantes, não utilizados, devem ser colocados na embalagem original com um dessecante. A embalagem deve ser fechada para proteger da humidade.

Procedimento de Ensaio

Deixe que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura da sala (18-25°C). Misture os reagentes cuidadosamente, invertendo com cuidado antes da utilização. Depois da reconstituição dos reagentes, misture cuidadosamente evitando a criação de espuma. Os calibradores, controlos e amostras devem ser ensaiados em duplicado.

1. Identificar os poços da placa a serem usados.
2. Coloque 50 µL dos calibradores, controlos e amostras nos poços apropriados.
3. Adicione 50 µL do tampão de amostra A a cada poço, utilizando uma pipeta de precisão.
4. Adicione 50 µL do tampão de amostra B a cada poço, utilizando uma pipeta de precisão.
5. Incube os poços, agitando a 500–700 rpm num agitador de micro-prato orbital, durante três horas à temperatura da sala (18-25°C).
6. Prepare a solução conjugada de anticorpo-enzima, diluindo o Concentrado de conjugado anticorpo-enzima no Diluyente de conjugado Inhibin A, conforme descrito na secção "Preparação dos reagentes" das instruções do pacote.
7. Aspire e lave cada poço seis vezes com uma solução de lavagem, utilizando uma lavadora de micro-prato automática, ou manualmente utilizando uma pipeta de precisão. Absorva e seque, invertendo o prato em material absorvente.

NOTA: A utilização de uma lavadora de micro-prato automática é fortemente recomendada. A lavagem incompleta afectará adversamente a precisão do ensaio. Se não estiver disponível uma lavadora de micro-prato, siga estes passos para lavar o prato manualmente:

(a) Aspire completamente o líquido de cada poço

(b) Coloque 350 µL da solução de lavagem em cada poço utilizando uma pipeta de precisão

(c) Aspire novamente o líquido

(d) Repita os passos (b) e (c) cinco vezes

8. Adicione 100 µL da solução conjugada anticorpo-enzima para cada poço utilizando uma pipeta de precisão.
9. Incube os poços, agitando a 500–700 rpm num agitador de micro-prato orbital, durante uma hora à temperatura da sala (18-25°C).
10. Aspire e lave cada poço seis vezes com a solução de lavagem, utilizando uma lavadora de micro-pratos automática. Absorva e seque, invertendo o prato em material absorvente.
11. Adicione 100 µL da solução de cromógeno TMB em cada poço utilizando uma pipeta de precisão.

Evitar a exposição directa à luz solar.

12. Incube os poços, agitando a 500–700 rpm num agitador de micro-prato orbital, durante 15 minutos à temperatura da sala (18-25°C).

NOTA: Não esqueça que a cor pode-se desenvolver mais rapidamente ou mais lentamente que o tempo de incubação recomendado, dependendo da temperatura da sala localizada. Controle visualmente o desenvolvimento da cor para otimizar o tempo de incubação.

13. Adicione 100 µL da solução tampão em cada poço utilizando uma pipeta de precisão.
14. Efetue a leitura da solução nos poços dentro de 30 minutos, utilizando um leitor de microplacas definido para 450 nm.

NOTA:

1) Durante a leitura da absorvância do poço de microtitulação, é necessário programar o calibrador zero como um "Branco".

2) Se a correção do comprimento de onda estiver disponível, defina o instrumento para medição de comprimento de onda duplo a 450 nm, com correção do comprimento de onda de fundo definida entre 600 e 630 nm.

RESULTADOS

1. Calcule a absorvância média para cada calibrador, controlo ou amostra.
2. Trace o registo das leituras de absorvância média para cada um dos calibradores ao longo do eixo y versus o registo das concentrações de inibina A em pg/mL ao longo do eixo x, utilizando um ajuste de curva linear. Alternativamente, os dados podem ser traçados de forma linear vs. linear e é possível utilizar um ajuste de curva polinomial suavizada.
3. Desenhe a melhor curva de ajuste através da média dos pontos duplicados.
4. Determine as concentrações de Inibina A dos controlos e das amostras a partir da curva padrão, fazendo corresponder as suas leituras de absorvância média com as concentrações de Inibina A correspondentes.
5. Qualquer leitura de amostra superior ao calibrador mais elevado deve ser adequadamente diluída utilizando o Calibrador 0 de Inibina A e novamente testada.
6. Qualquer amostra com uma leitura de absorvância menor que a sensibilidade analítica deve ser reportada.
7. Multiplicar o valor obtido pelo factor de diluição, se necessário.

NOTA: Se as leituras de absorvância excederem os limites do leitor de placas, será necessária uma segunda leitura a 405 nm (filtro de referência entre 600 e 630 nm se disponível). Nesse caso, prossiga com a construção de uma segunda curva padrão conforme acima com as leituras de absorvância de todos os calibradores a 405 nm. A concentração das amostras fora da escala a 450 nm é, em seguida, lida a partir da nova curva padrão. As leituras a 405 nm não deverão substituir as leituras dentro da escala a 450 nm.

Curva Padrão

Calibradores	Conc. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (em branco)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Exemplo de curva padrão, não utilize para cálculo)

Amostras

Para converter de UI/mL, utilize a equação seguinte:

1 UI/mL (WHO 91/624) = 26,7 pg/mL

VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência para garantir uma representação adequada das populações específicas. Os valores apresentados em seguida foram obtidos com o ELISA de Inibina A,

utilizando amostras de soro de adultos aparentemente saudáveis. Todos os valores são indicados em pg/mL. Para mulheres em idade fértil, os números sob cada fase representam os dias antes e depois do surto de LH.

População	n	Média	Mediana	95% de intervalo de confiança
Mulheres em idade fértil				
Fase folicular precoce (-14 a -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Folicular média (-9 a -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Folicular tardia (-3 a -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Ciclo médio (Dia 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Lútea precoce (1 a 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Lútea média (4 a 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Lútea tardia (12 a 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Níveis de pico de IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1690
PCOS — Ovulatório	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Pós-menopausa	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Homens normais	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Os valores de inibina A abaixo do Calibrador 1 são extrapolados.

Os valores representados na tabela seguinte são de inibina A de soro materno no segundo trimestre.

Semana completa	Nº. de amostras	Inibina A mediana (pg/mL)	LOG ₁₀ DP
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabela adaptada a partir de valores fornecidos por um centro de rastreio dos EUA (2005).

CONTROLO DE QUALIDADE

- Os controlos ELISA de Inibina A ou outros controlos comerciais devem situar-se dentro dos limites de confiança estabelecidos.
- Os limites de confiança para os controlos ELISA de Inibina A estão indicados num suplemento.
- Deve ser incluída em cada ensaio uma curva padrão completa, junto com controlos de nível baixo e alto.
- A solução de cromógeno TMB deve ser incolor. O desenvolvimento de coloração azul pode indicar contaminação ou instabilidade do reagente.
- Os materiais de controlo de qualidade simulam as características das amostras dos pacientes e são fundamentais para a monitorização do desempenho do sistema de ensaios imunoquímicos. Inclua o CQ ou outros materiais de controlo de qualidade disponíveis no mercado que abrangem, no mínimo, dois níveis de analitos. A utilização mais frequente de controlos ou a utilização de controlos adicionais é deixada ao critério do utilizador, com base nas boas práticas laboratoriais ou requisitos de acreditação do laboratório e legislação aplicável. Siga as instruções do fabricante relativamente à reconstituição e ao armazenamento. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores médios e intervalos aceitáveis para garantir um desempenho adequado. Os resultados de controlo de qualidade que não estiverem dentro dos intervalos aceitáveis podem indicar resultados de testes inválidos.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

(Para mais detalhes, veja a data sheet "APPENDIX")

São fornecidos dados representativos apenas para fins ilustrativos. O desempenho pode variar de um laboratório para outro.

Sensibilidade

Limite de deteção (LD): 2,61 pg/mL

Especificidade

O anticorpo utilizado no imunoensaio é altamente específico para Inibina A.

Precisão

Intra-ensaio

As amostras foram analisadas 25 vezes na mesma série. Foram encontrados coeficientes de variação inferiores ou iguais a 4,6% para amostras de soro.

Inter-ensaio

As amostras foram analisadas em duplicado em 10 séries diferentes. Foram encontrados coeficientes de variação inferiores ou iguais a 6,9% para amostras de soro.

Exactidão

Teste de Diluição

As amostras altamente concentradas foram diluídas em série com o calibrador zero. As percentagens de recuperação obtidas variaram entre 97,8 e 117%.

Teste de Recuperação

As amostras de concentração baixa foram misturadas com quantidades conhecidas de Inibina A. As percentagens de recuperação obtidas variaram entre 83,5 e 99,5%.

Intervalo de medição (desde o Limite de detecção ao calibrador mais elevado): 2,61 até aproximadamente 1000 pg/mL.

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos neste kit são otimizados para medir níveis de inibina A em soro ou plasma.
 - Para ensaios que utilizam anticorpos, existe a possibilidade de interferência por anticorpos heterófilos na amostra. As amostras de indivíduos que tenham sido expostos regularmente a animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou procedimentos de diagnósticos utilizando imunoglobulina ou respetivos fragmentos podem produzir anticorpos, por exemplo HAMA, que interferem com os imunoensaios. Para além disso, outros anticorpos heterófilos, como anticorpos humanos anticabra, podem estar presentes nas amostras.^{22,23} Tais anticorpos interferentes podem produzir resultados errados. Os resultados de pacientes suspeitos de terem estes anticorpos devem ser avaliados com cuidado.
 - Se existir evidência de contaminação microbiana ou turvação excessiva num reagente, elimine o frasco.
 - Os resultados do ELISA de Inibina A devem ser interpretados com base no quadro clínico geral do paciente, incluindo: sintomas, histórico clínico, dados de testes adicionais e outras informações apropriadas.
-

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

MÅ KUN BRUGES AF FAGPERSONER,

Inhibin A-enzymet, der er bundet til immunsorbentassaykittet (ELISA) indeholder materiale til den kvantitative måling af dimerisk inhibin A i humant serum eller plasma. Det er udelukkende beregnet til *in vitro* brug som et hjælpemiddel til diagnose og overvågning af forskellige hormonale reproduktive sygdomme.

Screening for Down's syndrom (Trisomy 21) i 2. trimester med en kombination af biokemiske og ultralyd-mærkører kan vurderes med passende algoritmer, der kan køres på kommercielt tilgængeligt software til risikovurdering.^{24,25} Det anbefales på det kraftigste at bruge godkendt (CE-mærket) software, der er specifikt beregnet til risikovurdering af Trisomy 21, f.eks. software alpha.* Inhibin A-kittet er beregnet til brug i kombination med hAFP + hCG + uE3.

RESUMÉ

Inhibiner er heterodimeriske proteinhormoner, der udskilles af granulosa-celler i ovarierne hos kvinden og i Sertoli-cellerne i testiklerne hos manden. De undertrykker selektivt frigørelsen af follikel stimulerende hormon (FSH) fra hypofysen og udfører også lokale paracrine handlinger i kønskirtlerne.^{1,2}

Den fuldt behandlede form af inhibinmolekylet har en molekylærvægt på omtrent 32 kD og består af to distinkte kæder (α og β), der er bundet til hinanden af disulfidbindinger. Former med højere molekylærvægte, med forstadieformer af α -underenheden, forekommer også i follikulær væske og serum. Derudover forekommer også frie α -underenhedsformer, uden tilknytning til en β -underenhed, og uden inhibin bioaktivitet.^{3,4,5,6}

Inhibin A består af en α -underenhed og en β_A -underenhed. Målinger af inhibin A har vist sig at være nyttige i studiet af dets rolle i den menneskelige reproduktive fysiologi.^{7,8,9} Adskillige offentliggjorte rapporter indikerer anvendeligheden af inhibin A-målinger som en endokrin markør til overvågning af den ovariale funktion.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Indtil for nyligt var det ikke muligt at skelne mellem cirkulerende, funktionel dimerisk inhibin og fri α -underenhed i den normale menneskelige menstruelle cyklus.

Ved brug af et par højt karakteristiske antisoffer er det blevet fastslået, at den to-sidede sandwich-ELISA specifikt kan måle kun den dimeriske inhibin A.¹⁸

PRINCIP

Inhibin A ELISA er en enzymetrisk forstærket to-trins "sandwich"-assay. I assayet, inkuberes kalibratorer, kontroller og prøver i mikrotiterbrønde, som er blevet coated med anti-inhibin β_A underenhedsantistof. Efter inkubation og skylning tilføjes anti-inhibin α -underenhedsdetekteringsantistof med mærket peroxidase fra peberrod (HRP) til hver brønd. Efter yderligere en omgang med inkubation og skylning, tilføjes substrat tetrametylbenzidin (TMB) til brøndene.

Til sidst tilsættes en syrestoppende opløsning. Graden af enzymturnoverhastigheden for substratet bestemmes ved absorbansmåling med dobbelt bølglængde ved 450 nm og mellem 600 og 630 nm. Den målte absorbans er direkte proportional med koncentrationen af inhibin A i prøverne. Et sæt med inhibin A-kalibratorer anvendes til at plotte en absorbansstandardkurve i forhold til inhibin A-koncentrationen. Inhibin A-koncentrationerne i prøverne kan derefter beregnes fra denne standardkurve.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Til *in vitro* diagnostisk brug.

Brug god laboratoriepraksis.¹⁹

Prøver og blodafledte produkter kan behandles rutinemæssigt med minimal risiko vha. den beskrevne procedure. Håndter dog disse produkter som potentielt smitsomme iht. universelle forholdsregler og god klinisk laboratoriepraksis, uagtet deres oprindelse, behandling eller tidligere certificering.²⁰ Anvend et passende desinficeringsmiddel til dekontaminering. Disse materialer og deres beholdere skal opbevares og bortskaffes i overensstemmelse med lokale bestemmelser og retningslinjer.

GHS FAREKLASSIFIKATION

Calibrators / Controls ADVARSEL



H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
H412	Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.
P273	Undgå udledning til miljøet.
P280	Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.
P333+P313	Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.
P362+P364	Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden anvendelse. en blanding af: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EF nr. 247-500-7] og 2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EF nr. 220-239-6] (3:1) <0,05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate ADVARSEL



H316	Forårsager mild hudirritation.
H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
H412	Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.
P273	Undgå udledning til miljøet.
P280	Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.
P332+P313	Ved hudirritation: Søg lægehjælp.
P333+P313	Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.
P362+P364	Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden anvendelse. 3-(n-morpholino)-2-hydroxypropansulfonatriumsalt 1 - 2% en blanding af: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EF nr. 247-500-7] og 2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EF nr. 220-239-6] (3:1) <0,05%

Sample Buffer A FARE



H316	Forårsager mild hudirritation.
H318	Forårsager alvorlig øjenskade.
P280	Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.
P305+P351+P338	VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
P310	Ring straks til en GIFTINFORMATION eller en læge.
P332+P313	Ved hudirritation: Søg lægehjælp. Natriumlaurylsulfat 1 - < 3% Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (methylamin) 1 - 2% Alkohol, C12-14-sekundær, ethoxylet 3 - 5%

Sample Buffer B

FARE



H314

Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader.

H317

Kan forårsage allergisk hudreaktion.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P303+P361+P353

VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Skyl under koldt vand.

P305+P351+P338

VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

P310

Ring straks til en GIFTINFORMATION eller en læge.

P333+P313

Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.

P362+P364

Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden anvendelse. Urinstofhydrogenperoxid 10 - 20%

en blanding af:
5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on Wash solution (20x)
[EF nr. 247-500-7] og
2-methyl-4-isothiazolin-3-on
[EF nr. 220-239-6] (3:1)
< 0,05%

Spærreopløsning A

FARE



H314

Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P301+P330+P331

I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Skyl munden. Fremkald IKKE opkastning.

P303+P361+P353

VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Skyl under koldt vand.

P305+P351+P338

VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

P310

Ring straks til en GIFTINFORMATION eller en læge.

Svovlsyre 1 - 3%

FARE



H360

Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn.

P201

Indhent særlige anvisninger før brug.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P308+P313

VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.
Borsyre 0,1 - 0,3%
Natriumboratdecahydrat 0,1 - 0,3%

Conjugate Diluent

FARE



H316

Forårsager mild hudirritation.

H317

Kan forårsage allergisk hudreaktion.

H318

Forårsager alvorlig øjenskade.

H412

Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.

P273

Undgå udledning til miljøet.

P280

Bær beskyttelseshandsker, beskyttelsestøj og øjen-/ansigtsbeskyttelse.

P305+P351+P338

VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

P310

Ring straks til en GIFTINFORMATION eller en læge.

P333+P313

Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.

P362+P364

Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden anvendelse. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (methylamin) 1 - 3%



Sikkerhedsdatablad er tilgængelig på beckmancoulter.com/techdocs

INDSAMLING, BEHANDLING, OPBEVARING OG FORTYNDING AF PRØVER

Serum og plasma er de anbefalede prøver.

Overhold følgende anbefalinger om håndtering, bearbejdning og opbevaring af blodprøver.²¹

- Alle blodprøver tages, idet rutinemæssige forholdsregler for venepunktur iagttages.
- Prøverør skal altid være tilproppede.
- Overfør mindst 500 µL cellefri prøve, inden for to timer efter centrifugering, til et opbevaringsprøverør. Sæt omgående prop på prøverøret.
- Opbevar ufortyndede eller fortyndede prøver tæt tillukket ved 2-8 °C i højst 24 timer.
- Hvis assayet ikke vil blive fuldført i løbet af 24 timer, eller hvis der skal fragtes prøver, skal assayet nedfryses ved -20 °C eller koldere i op til 30 dage.

Brug de følgende retningslinjer ved klargøring af prøver:

- Sørg for at resterende fibrin- og cellularmaterialer er blevet fjernet før analyse.
- Følg centrifugeringsanbefalingerne fra fabrikanten af blodtapningsrør.

Det individuelle laboratorium bør bestemme acceptabilitet for sine egne blodtapningsrør og serumadskillelsesprodukter. Variationer i disse produkter kan eksistere mellem fabrikanter og til tider mellem lot.

Undgå gentagen frysning og optøning af prøver.

Undgå analysering af lipæmiske, iktæriske eller hæmolyserede prøver.

LEVEREDE MATERIALER

Kit til bestemmelse af inhibin A: 96 brønde (Kat. #DSL-10-28100T-1)

Microtiterstrips coated med anti-inhibin A-antistof: En stripholder, indeholdende 96 microtiterbrønde.

Mikrotiterbrønde af polystyren med anti-inhibin β_A immobiliseret til indersiden af væggen på hver brønd.

Skal opbevares ved 2 til 8 °C til udløbsdatoen i den genlukkelige pose med et tørremiddel.

Koncentrat af inhibin A antistof-enzymkonjugat: et 0,6 mL hætteglas

Musemonoklonalt anti-inhibin α -underenhed antistof-HRP konjugat, MOPSO, BSA og < 1,0% ProClin** 300.

Opbevares ved 2 til 8 °C frem til udløbsdatoen.

Fortynd før brug i konjugatfortyndingsmiddel.

Kalibrаторer: Seks 1 mL hætteglas og et 2 mL hætteglas med "nul" kalibrаторer (klar-til-brug)

Koncentrationer på omtrent 0, 10, 30, 100, 250, 500 og 1000 pg/mL rekombinant dimerisk inhibin A i bovin serum med < 0,5% ProClin 300.

Se hætteglasmærkaterne for de nøjagtige koncentrationer.

Opbevares uåbnet ved 2 til 8 °C frem til udløbsdagen.

Stabil ved 2 til 8 °C i 28 dage efter indledningsvis brug. For længere perioder, opbevar i en fryser ved -20 °C (-15 °C til -24 °C) indtil udløbsdato.

Måleenheden (analyt) i inhibin A-kalibrаторer er sporbare til World Health Organization First International Standard for Inhibin-A (kode 91/624), som indeholder rekombinant 32 kDa humant inhibin A (1 pg/mL eller 0,037 IE/mL). De tildelte værdier blev fastslået ved brug af repræsentative prøver fra dette standardlot og er specifikke for analysemetodologier for reagenserne. Værdier, som tildeles ved hjælp af andre metodologier, kan være anderledes. Hvis der er sådanne forskelle, kan de skyldes forskydninger mellem metoder.

Kontroller: to 1,0 mL hætteglas (klar-til-brug)

Lave og høje koncentrationer af rekombinant dimerisk inhibin A i bovin serum med < 0,5% ProClin 300.

Konfidensgrænserne for kontroller er trykt på tillægget.

Opbevares uåbnet ved 2 til 8 °C frem til udløbsdagen.

Stabil ved 2 til 8 °C i 28 dage efter indledningsvis brug. For længere perioder, opbevar i en fryser ved -20 °C (-15 °C til -24 °C) indtil udløbsdato.

Prøvebuffer A: En 10,0 mL flaske

Buffer med bovin serum albumin (BSA), dyreserum (ged, mus), surfactant og natriumazid.

Opbevares ved 2 til 8 °C frem til udløbsdatoen.

Prøvebuffer B: En 10,0 mL flaske

Buffer med < 20% carbamidperoxid, < 0,5% ProClin 300 og natriumazid.

Opbevares ved 2 til 8 °C frem til udløbsdatoen.

TMB-kromogenopløsning: En 11,0 mL flaske

Tetrametylbenzidin (TMB) i citratbuffer med hydrogenperoxid.

Opbevares ved 2 til 8 °C frem til udløbsdatoen.

Stopopløsning A: En 11,0 mL flaske

0,2 M svovlsyre.

Opbevares ved 2 til 8 °C eller stuetemperatur (18-25 °C) frem til udløbsdatoen.

Konjugatfortyndingsmiddel: En 15,0 mL flaske

Buffer med BSA, dyreserum (ged, mus), surfactant og < 1,0% ProClin 300.

PI-DSL1028100T-04

Opbevares ved 2 til 8 °C frem til udløbsdatoen.

Skylleopløsning U (20X): Ét 50 mL hætteglas

Koncentrerede opløsninger skal fortyndes før brug.

Opbevares ved 2 til 8 °C eller stuetemperatur (18-25 °C) frem til udløbsdatoen.

Kit til bestemmelse af inhibin A: 384 brønde (Kat. #DSL-10-28100T-4)

Microtiterstrips coated med anti-inhibin A-antistof: Fire stripholdere, der hver indeholder 96 microtiterbrønde.

Koncentrat af inhibin A antistof-enzymkonjugat: fire 0,6 mL hætteglas

Kalibrаторer: Tolv 1 mL hætteglas og to 2 mL hætteglas med "nul" kalibrаторer (klar-til-brug)

Kontrolsera: fire 1,0 mL hætteglas (klar-til-brug)

Prøvebuffer A: Fire 10,0 mL flasker

Prøvebuffer B: Tre 10,0 mL flasker

TMB-kromogenopløsning: En 50,0 mL flaske

Stopopløsning A: Fire 11,0 mL flasker

Konjugatfortyndingsmiddel: Fire 15,0 mL flasker

Skylleopløsning (20X): to 50 mL hætteglas

MATERIALER PÅKRÆVET, MEN IKKE LEVERET

Ud over almindeligt laboratorieudstyr skal følgende bruges:

- Mikrotiterpladelæser, der kan måle absorbans ved 450 nm og gerne kan korrigere dobbelt bølgelængde mellem 600 og 630 nm
- Deioniseret vand
- Præcisionspipette til levering af 50-100 μ L
- Mikrotiterpladestyrer med kapacitet på 500-700 orbitale omdrejninger pr. minut (omdr/m)
- Mikrotitreringspladevasker
- Vortex-mikser
- Absorberende materiale til farvning af stripsene
- Grafpapir til manuel databehandling

PROCEDURE

Procedurebemærkninger

- En grundig forståelse af denne pakkeindlægsseddel er nødvendig for korrekt brug af inhibin A ELISA.
- Det er kundens ansvar at validere analysen til eget brug.
- Der opnås kun pålidelige resultater ved at bruge præcise laborieteknikker og nøjagtigt at følge pakkens indstiksseddel.
- Der skal inkluderes en standardkurve i hver assay.
- Lad alle sættets reagenser få stuetemperatur (18-25°C) før brug.
- Bland reagenserne omhyggeligt før brug ved forsigtig vending.
- Bland ikke forskellige lots af nogen sætkomponent inden for en individuel analyse.
- Anvend ikke en komponent efter udløbsdatoen.
- Ukomplet vask vil have en ugunstig påvirkning på resultatet og analysepræcisionen.
- Vær omhyggelig med at tilføje stopopløsningen i brøndene i samme rækkefølge og hastighed, som TMB-kromogenopløsningen tilføjes i, for at minimere potentiel analyseafvigelse som følge af i variation i substraternes inkubationstid.
- Håndter alle reagenser forsigtigt for ikke at introducere mikrobielle urenheder, der kan beskadige reagenserne, især konjugatfortyndingsmidlet og prøvebuffer A.
- Undgå kontaminering af TMB-kromogenopløsningen med konjugaterne.
- Brug en ren éngangspipettespids til hvert reagens, hver kalibrator, kontrol eller prøve.
- Undgå pipetter med metaldele ved dosering af svovlsyre og TMB-kromogenopløsning.

- Enzymet, der bruges som mærkningen, inaktiveres af oxygen, og er yderst følsom over for mikrobiel kontaminering, natriumazid, hypochlorsyre og aromatiske klorkulbrinter, findes ofte i laboratoriers vandforsyning.
- Brug deioniseret vand.
- Undgå at eksponere reagenserne for stærk varme eller direkte sollys under opbevaring og inkubation.

Klargøring af reagenser

1. **Skylleopløsning:** Indholdet i hætteglasset hældes over i 950 mL destilleret vand og homogeniseres. Den fortyndede opløsning kan opbevares ved 18-25 °C i én måned eller ved 2-8 °C indtil kittets udløbsdato.
2. **Opløsning af inhibin A-antistof-enzymkonjugat:** Koncentratet af inhibin A-antistof-enzymkonjugat skal fortyndes i forholdet 1 del til 50 dele inhibin A-konjugatfortyndingsmiddel, i forhold til det brugte antal brønde. For en hel plade, pipetter nøjagtigt 220 µL koncentrat af inhibin A-antistof-enzymkonjugat i 11 mL konjugatfortyndingsmiddel.
BEMÆRK: Koncentratet af inhibin A-antistof-enzymkonjugat skal være frisk fortyndet 10-15 minutter før brug.
3. **Mikrotitreringsbrønde:** Vælg det antal coatede brønde, der er nødvendige for analysen. De resterende ubrugte brønde skal anbringes i den genlukkelige pose med et tørremiddel. Posen skal lukkes igen for at beskytte mod fugt.

Assayproceduren

Lad alle prøver og reagenser opnå stuetemperatur (18-25°C). Bland reagenserne grundigt ved forsigtig inversion før brug. Efter genfortynding af reagenserne, bland grundigt, undgå skum. Kalibratorer, kontroller og prøver skal analyseres i duplikat.

1. Markér de mikrotitreringsstrips, der skal bruges.
2. Pipetter 50 µL kalibratorer, kontroller og prøver til de relevante brønde.
3. Tilføj 50 µL prøvebuffer A til hver brønd med en præcisionspipette.
4. Tilføj 50 µL inhibin prøvebuffer B til hver brønd med en præcisionspipette.
5. Inkuber brøndene ved rystning ved 500-700 omdr/m i en orbitalmikropladeryster i mindst tre timer ved stuetemperatur (18-25°C).
6. Forbered opløsningen af antistof-enzymkonjugat ved at fortynde koncentratet af antistofenzymkonjugat i inhibin A-konjugatfortyndingsmediet som beskrevet under afsnittet "Forberedelse af reagenser" i denne pakkeindlægsseddel.
7. Opsug og vask hver brønd seks gange med skylleopløsningen med en automatisk mikropladevasker eller manuelt med en præcisionspipette. Tør pladen ved at vende den på hovedet på et absorberende materiale.

BEMÆRK: Det anbefales på det kraftigste at bruge en automatisk mikropladevasker. Utilstrækkelig afvaskning vil negativt påvirke assaypræcision. Følg disse trin for at vaske pladen manuelt, hvis en mikropladevasker ikke er tilgængelig:

- (a) Opsug væsken fuldstændigt fra hver brønd
 - (b) Dispenser 350 µL vaskeopløsning i hver brønd med en præcisionspipette
 - (c) Opsug væsken igen
 - (d) Gentag trinnene (b) og (c) fem gange
8. Tilføj 100 µL opløsning af antistof-enzymkonjugat til hver brønd med en præcisionspipette.
 9. Inkuber brøndene ved rystning ved 500-700 omdr/m i en orbitalmikropladeryster i mindst en time ved stuetemperatur (18-25 °C).
 10. Opsug og vask hver brønd seks gange med skylleopløsningen med en automatisk mikropladevasker. Tør pladen ved at vende den på hovedet på et absorberende materiale.
 11. Tilføj 100 µL TMB kromogenopløsning til hver brønd med en præcisionspipette.

Undgå eksponering for direkte sollys.

12. Inkuber brøndene ved rystning ved 500-700 omdr/m i en orbitalmikropladeryster i 15 minutter ved stuetemperatur (18-25 °C).

BEMÆRK: Vær opmærksom på, at farven kan udvikles hurtigere eller langsommere end den anbefalede inkubationstid afhængigt af den lokale rumtemperatur. Overvåg visuelt farveudviklingen for at optimere inkubationstiden.

13. Tilføj 100 µL stoppeopløsning til hver brønd med en præcisionspipette.

14. Aflæs absorbansen af opløsningen i brøndene inden for 30 minutter med en mikropladelæser, der er indstillet til 450 nm.

BEMÆRK:

1) Under aflæsning af mikrotiterbrøndens absorbans er det nødvendigt at programmere nul kalibrator som en "Blank".

2) Hvis bølgelængdekorrektion er tilgængelig, indstilles instrumentet til dobbelt bølgelængdemåling ved 450 nm med baggrunds bølgelængdekorrektion indstillet mellem 600 og 630 nm.

RESULTATER

1. Beregn den gennemsnitlige absorbans for hver kalibrator, kontrol eller prøve.
2. Plot loggen med gennemsnitlige absorbans aflæsninger for hver af kalibratoren langs y-aksen versus loggen med inhibin A-koncentrationerne i pg/mL langs x-aksen, med en lineær kurvetilpasning. Alternativt kan dataene plottes lineært vs. lineært, og en udglattet spline-kurvetilpasning kan bruges.
3. Tegn den bedst passende kurve ved hjælp af gennemsnittet af duplikatpunkterne.
4. Fastslå inhibin A-koncentrationerne i kontroller og prøver fra standardkurven ved at sammenligne deres gennemsnitlige absorbans aflæsninger med de tilsvarende inhibin A-koncentrationer.
5. Enhver prøve aflæsning højere end den højeste kalibrator skal passende fortyndes med inhibin A kalibrator 0, og genanalyseres.
6. Enhver prøvelæsning, der er lavere end den analytiske følsomhed, skal rapporteres som sådan.
7. Multipliser værdien med fortyndingsfaktor, om nødvendigt.

BEMÆRK: Hvis absorbans aflæsningerne overstiger grænserne for pladelæseren, er en yderligere aflæsning ved 405 nm nødvendig (referencefilter mellem 600 og 630 nm, hvis tilgængeligt). I så tilfælde fortsættes der med at konstruere en nummer to standardkurve som ovenfor med absorbans aflæsninger af alle kalibratoren ved 405 nm. Koncentrationen af prøver uden for skalaen ved 450 nm aflæses derefter fra den nye standardkurve. Aflæsningerne ved 405 nm skal ikke erstatte aflæsningen på skalaen ved 450 nm.

Standardkurve

Kalibratoren	Konc. (pg/mL)	A	B/B _{maks} (%)
0	0,00	0,022 (Blank)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Eksempel på standardkurve, må ikke anvendes til beregning).

Prøver

Brug følgende formel for at konvertere fra IE/mL:

$$1 \text{ IE/mL (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

FORVENTEDE VÆRDIER

Det enkelte laboratorium skal etablere sine egne referenceintervaller for at sikre korrekt repræsentation af specifikke populationer. Følgende præsenterede værdier blev opnået med inhibin A ELISA ved brug af serumprøver fra tilsyneladende normale raske voksne. Alle værdier angives i pg/mL. For kvinder med normal cyklus repræsenterer tal under hver fase dage før eller efter LH-stigning.

Population	n	Gennemsnit	Gennemsnit	95% konfidens interval
Kvinder med normal cyklus				
Tidlig follikelfase (-14 til -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Midtfollikulær (-9 til -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Sent follikulær (-3 til -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Midtcyklus (Dag 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Tidlig luteal (1 til 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Midt luteal (4 til 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Sen luteal (12 til 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
IVF-peakniveauer	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1690
PCOS - Ægløsning	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Postmenopausal	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Normale mænd	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Inhibin A-værdier under Kalibrator 1 ekstrapoleres.

Værdierne i følgende tabel er maternal serum-inhibin A i andet trimester.

Gennemført uge	Antal prøver	Median inhibin A (pg/mL)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabel tilpasset fra værdier fra et screeningcenter i USA (2005).

KVALITETSKONTROL

- Inhibin A ELISA-kontrollerne eller andre kommercielle kontroller skal ligge indenfor de etablerede konfidensgrænser.
- Konfidensgrænserne for inhibin A ELISA-kontroller er trykt på tillægget.
- En komplet standardkurve, plus lave og høje kontroller, skal inkluderes i hvert assay.
- TMB-chromogenopløsningen skal være uden fra farveløs til meget lys gul. Udvikling af en blå farve kan indikere, at reagenset er kontamineret eller ustabil.
- Kvalitetskontrolmaterialer simulerer karakteristika af prøver og er vigtige for monitorering af systemydelsen ved immunkemiske analyser. Medtag QC eller andet kommercielt tilgængeligt kvalitetskontrolmateriale, der dækker mindst to analytiske niveauer. Hyppigere brug af kontroller eller brug af yderligere kontroller er efter brugerens skøn baseret på god laboratoriepraksis eller krav til laboratorieakkreditering og gældende love. Følg producentens anvisninger vedrørende restitution og opbevaring. Hvert laboratorium skal etablere gennemsnitsværdier og acceptable områder til at sikre en korrekt ydelse. Kvalitetskontrolresultater, der ikke falder inden for acceptable områder, kan være en indikation på ugyldige testresultater.

PRÆSTATIONSKARAKTERISTIKA

(Der henvises til dataarket i "TILLÆGET" for yderligere oplysninger)

Repræsentative data er udelukkende til illustrationsmæssige formål. Præstationsresultater kan variere afhængig af de individuelle laboratorier.

Sensitivitet

Detektionsgrænse: 2,61 pg/mL

Specificitet

Det antistof, der anvendes i immunanalysen, er meget specifikt over for inhibin A.

Præcision

Inden for samme analyse

Prøverne blev analyseret 25 gange i den samme serie. Variationskoefficienterne fandtes at være under eller lig med 4,6% for serumprøver.

Mellem analyser

Prøverne blev analyseret i duplikat i 10 forskellige serier. Variationskoefficienterne fandtes at være under eller lig med 6,9% for serumprøver.

Nøjagtighed

Fortyndingstest

Prøver med høje koncentrationer blev seriefortyndet med nulkalibrator. De opnåede genfindingsprocenter lå mellem 97,8% og 117%.

Genfindingstest

Prøver med lav koncentration blev spiked med kendte mængder af inhibin A. De opnåede genoprettelsesprocenter lå mellem 83,5% og 99,5%.

Måleinterval (fra detektionsgrænse til den højeste kalibrator): 2,61 til cirka 1000 pg/mL.

BEGRÆNSNINGER

- Reagenserne i dette kit er optimeret til at måle inhibin A-niveauer i serum eller plasma.
- I tilfælde af analyser, der benytter antistoffer, er der mulighed for interferens fra heterofile antistoffer i prøven. Prøver fra personer, som regelmæssigt har været eksponeret for dyr, har fået immunbehandling eller har gennemgået diagnostiske procedurer ved hjælp af immunglobuliner eller immunglobulinfragmenter, kan producere antistoffer f.eks. HAMA, som interfererer med immunanalysen. Hertil kommer, at der kan være andre heterofile antistoffer, f.eks. humane anti-ged-antistoffer, i prøver.^{22,23} Sådanne interferensantistoffer kan give fejlagtige resultater. Resultater for patienter, som er mistænkt for at have disse antistoffer, skal undersøges omhyggeligt.
- Hvis der forekommer tegn på mikrobiel kontaminering eller voldsom turbiditet i et reagens, skal hætteglasset kasseres.
- Inhibin A ELISA-resultaterne skal fortolkes under hensyntagen til det samlede kliniske billede af patienten, herunder: symptomer, klinisk historie, data fra yderligere test og anden aktuel information.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ,

Το kit ενζυμικής ανοσοπροσοφθητικής ανάλυσης ανασταλίνης Α (ELISA) παρέχει υλικά για την ποσοτική μέτρηση της διμερούς ανασταλίνης Α στον ανθρώπινο ορό ή το πλάσμα. Προορίζεται αυστηρά για *in vitro* χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση και παρακολούθηση διαφόρων ορμονικών ανασταλινικών διαταραχών. Η ανίχνευση του συνδρόμου Down (Τρισωμία 21) κατά το 2^ο τρίμηνο με χρήση συνδυασμένων βιοχημικών και υπερηχογραφικών δεικτών, μπορεί να αξιολογηθεί με κατάλληλους αλγόριθμους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό υπολογισμού κινδύνου.^{24, 25} Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση επικυρωμένου λογισμικού (που φέρει σήμανση CE) ειδικά σχεδιασμένου για την αξιολόγηση του κινδύνου της Τρισωμίας 21, π.χ. το λογισμικό alpha.* Το kit ανασταλίνης Α προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με hAFP + hCG + uE3.

ΣΥΝΟΨΗ

Οι ανασταλίνες είναι ετεροδιμερείς πρωτεϊνικές ορμόνες που εκκρίνονται από τα κοκκιόκυτταρα των ωοθηκών στις γυναίκες και στα κύτταρα Sertoli των όρχεων στους άνδρες. Καταστέλλουν επιλεκτικά την έκκριση της ορμόνης διέγερσης των θυλακίων της υπόφυσης (FSH) και έχουν επίσης τοπικές παρακρινικές δράσεις στις γονάδες.^{1,2}

Η πλήρως επεξεργασμένη μορφή του μορίου της ανασταλίνης έχει μοριακό βάρος περίπου 32 kD και αποτελείται από τις δύο ξεχωριστές αλυσίδες (α και β) που συνδέονται με δισουλφιδικές γέφυρες. Μορφές υψηλότερου μοριακού βάρους, με πρόδρομες μορφές της α-υπομονάδας, εμφανίζονται επίσης στο υγρό ωοθυλάκιου και τον ορό. Επιπλέον, υπάρχουν επίσης ελεύθερες μορφές α-υπομονάδας, μη συνδεδεμένες με β-υπομονάδα και με έλλειψη βιοδραστικότητας ανασταλίνης.^{3,4,5,6}

Η ανασταλίνη Α αποτελείται από μια υπομονάδα α και μια υπομονάδα β_α. Οι μετρήσεις της ανασταλίνης αποδεικνύονται χρήσιμες στη μελέτη του ρόλου της στην φυσιολογία της ανθρώπινης αναπαραγωγής.^{7,8,9} Πολλές δημοσιευμένες αναφορές υποδεικνύουν τη χρησιμότητα της μέτρησης της ανασταλίνης Α ως ενδοκρινικού δείκτη για την παρακολούθηση της λειτουργίας των ωοθηκών.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Μέχρι πρόσφατα, δεν ήταν δυνατή η διάκριση μεταξύ της δραστικής διμερούς ανασταλίνης στην κυκλοφορία του αίματος και της ελεύθερης υπομονάδας α στον φυσιολογικό ανθρώπινο έμμηνο κύκλο.

Ωστόσο, με τη χρήση του υψηλά χαρακτηρισμένου ζεύγους αντισωμάτων, διαπιστώθηκε ότι ο προσδιορισμός ELISA δύο θέσεων (τύπου «sandwich») έχει τη δυνατότητα να μετράει ειδικά μόνο τη διμερή ανασταλίνη Α.¹⁸

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση ανασταλίνης Α ELISA είναι μια ενζυματικά ενισχυμένη ανάλυση τύπου «sandwich» δύο βημάτων. Κατά την ανάλυση, τα βαθμονομητές, οι μάρτυρες και τα δείγματα επωάζονται σε βυθίσματα μικροπιλοδότσης που έχουν επικαλυφθεί με αντίσωμα υπομονάδας β_α αντι-ανασταλίνης β. Μετά την επώαση και την έκπλυση, προστίθεται αντίσωμα ανίχνευσης υπομονάδας άλφα αντι-ανασταλίνης επισημασμένο με υπεροξειδάση αγριοραπαανίδας (HRP) σε κάθε βύθισμα. Μετά από ένα δεύτερο στάδιο επώασης και έκπλυσης, το υπόστρωμα τετραμεθυλβενζιδίνη (TMB) προστίθεται στα βυθίσματα.

Τέλος, προστίθεται όξινο διάλυμα αναστολής. Ο βαθμός ενζυματικής μετατροπής του υποστρώματος προσδιορίζεται με μέτρηση απορρόφησης διπλού μήκους κύματος στα 450 nm και μεταξύ των 600 και 630 nm. Η μετρηθείσα απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της ανασταλίνης Α στα δείγματα. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο βαθμονομητές ανασταλίνης Α για την απεικόνιση μιας πρότυπης καμπύλης απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης της ανασταλίνης Α. Οι συγκεντρώσεις ανασταλίνης Α στα δείγματα μπορούν στη συνέχεια να υπολογιστούν από αυτή την πρότυπη καμπύλη.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ



Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.







Τηρείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές.¹⁹

Τα δείγματα και τα προϊόντα αίματος μπορούν να υποβάλλονται σε συνήθη επεξεργασία με ελάχιστο κίνδυνο χρησιμοποιώντας τη διαδικασία που περιγράφεται. Χειρίζεστε ωστόσο τα προϊόντα αυτά ως δυνητικά μολυσματικά, τηρώντας τις γενικές προφυλάξεις και τις ορθές κλινικές εργαστηριακές πρακτικές, ανεξάρτητα από την προέλευση, την επεξεργασία

ή την προηγούμενη πιστοποίησή τους.²⁰ Χρησιμοποιείτε κατάλληλο απολυμαντικό για την απολύμανση. Φυλάσσετε και απορρίψτε τα υλικά αυτά, καθώς και τους περιέκτες τους, σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΣ

Calibrators / Controls	ΠΡΟΣΟΧΗ	
		
H317		Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
H412		Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.
P273		Να αποφεύγεται η απελευθέρωση στο περιβάλλον.
P280		Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
P333+P313		Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.
P362+P364		Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα χρησιμοποιήσετε. μάζα αντίδρασης από: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολιν-3-όνη [αριθ. ΕΚ 247-500-7] και 2-μεθυλο-4-ισοθειαζολ-3-όνη [αριθ. ΕΚ 220-239-6] (3:1) <0,05%
Antibody Enzyme Conjugate Concentrate	ΠΡΟΣΟΧΗ	
		
H316		Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.
H317		Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
H412		Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.
P273		Να αποφεύγεται η απελευθέρωση στο περιβάλλον.
P280		Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
P332+P313		Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.
P333+P313		Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.
P362+P364		Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα χρησιμοποιήσετε. 3-(N-Μορφολινο)-2-υδροξυ Προπάνιο Σουλφονικό οξύ, Άλας νατρίου 1 - 2%

Sample Buffer A	ΚΙΝΔΥΝΟΣ 		μάζα αντίδρασης από: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολιν-3-όνη [αριθ. ΕΚ 247-500-7] και 2-μεθυλ-4-ισοθειαζολ-3-όνη [αριθ. ΕΚ 220-239-6] (3:1) <0,05%	P333+P313	Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.	
				P362+P364	Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα χρησιμοποιήσετε. Ένωση ουρίας - υπεροξειδίου του υδρογόνου 10 - 20%	
		H316	Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.		μάζα αντίδρασης από: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολιν-3-όνη [αριθ. ΕΚ 247-500-7] και 2-μεθυλ-4-ισοθειαζολ-3-όνη [αριθ. ΕΚ 220-239-6] (3:1) < 0,05%	
		H318	Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.			
		P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.	Conjugate Diluent	ΚΙΝΔΥΝΟΣ	
		P305+P351+P338	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.		 	
		P310	Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.		H316	Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος.
		P332+P313	Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό. Λαουρυλοθειικό νάτριο 1 - < 3% Τρισ(υδροξυμεθυλ)- αμινομεθάνη 1 - 2% Αλκοόλη, δευτεροταγής C12-14, αιθοξυλιωμένη 3 - 5%		H317	Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
					H318	Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.
					H412	Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.
Sample Buffer B	ΚΙΝΔΥΝΟΣ  			P273	Να αποφεύγεται η απελευθέρωση στο περιβάλλον.	
				P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.	
				P305+P351+P338	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.	
		H314	Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες.		P310	Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.
		H317	Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.		P333+P313	Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό.
		P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.		P362+P364	Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα χρησιμοποιήσετε. Τρισ(υδροξυμεθυλ)- αμινομεθάνη 1 - 3% Αλκοόλη, δευτεροταγής C12-14, αιθοξυλιωμένη 3 - 5%
		P303+P361+P353	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): ξεπλύντε την επιδερμίδα με νερό.		μάζα αντίδρασης από: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολιν-3-όνη [αριθ. ΕΚ 247-500-7] και 2-μεθυλ-4-ισοθειαζολ-3-όνη [αριθ. ΕΚ 220-239-6] (3:1) < 0,05%	
		P305+P351+P338	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.			
		P310	Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό.	Διάλυμα αναστολής A	ΚΙΝΔΥΝΟΣ 	

H314	Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες.
P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
P301+P330+P331	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Ξεπλύνετε το στόμα. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό.
P303+P361+P353	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Ξεπλύντε την επιδερμίδα με νερό.
P305+P351+P338	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.
P310	Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. Θεϊκό οξύ 1 - 3%

Wash solution (20x)

ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H360	Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο.
P201	Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
P280	Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
P308+P313	Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό. Βορικό οξύ 0,1 - 0,3% Δεκαένυδρο βορικό νάτριο 0,1 - 0,3%

SDS Το δελτίο δεδομένων ασφαλείας διατίθεται στη διεύθυνση beckmancoulter.com/techdocs

ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα συνιστώμενα δείγματα είναι ορός και πλάσμα.

Τηρείτε τις ακόλουθες συστάσεις για το χειρισμό, την επεξεργασία και τη φύλαξη δειγμάτων αίματος.²¹

- Συλλέξτε όλα τα δείγματα αίματος τηρώντας τις συνήθεις προφυλάξεις για φλεβοπαρακέντηση.
- Να διατηρείτε πάντα τους σωλήνες κλειστούς με τα επιστόμιά τους.
- Εντός δύο ωρών μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέρετε τουλάχιστον 500 µL του ελεύθερου κυττάρων δείγματος σε ένα σωληνάριο αποθήκευσης. Κλείστε ερμητικά το σωληνάριο αμέσως.
- Φυλάσσετε τα μη αραιωμένα ή τα αραιωμένα δείγματα σφραγισμένα σφίχτα στους 2–8 °C για διάστημα που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.
- Αν η ανάλυση δεν πρόκειται να ολοκληρωθεί εντός 24 ωρών ή αν η αποστολή των δειγμάτων πρόκειται να υπερβεί αυτό το διάστημα, καταψύξτε σε θερμοκρασία –20 °C ή χαμηλότερη για διάστημα έως 30 ημερών.

Χρησιμοποιήστε τις παρακάτω κατευθυντήριες οδηγίες κατά την προετοιμασία των δειγμάτων:

- Βεβαιωθείτε ότι η υπολειμματική ινική και το κυτταρικό υλικό έχουν απομακρυνθεί πριν από την ανάλυση.
- Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή των σωληναρίων συλλογής αίματος σχετικά με τη φυγοκέντρηση.

Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίζει τα αποδεκτά όρια για τα δικά του σωληνάρια συλλογής αίματος και τα προϊόντα διαχωρισμού ορού. Ενδέχεται να υπάρχουν διαφορές σε αυτά τα προϊόντα μεταξύ κατασκευαστών και, μερικές φορές, μεταξύ παρτίδων.

Αποφύγετε να ψύχετε και να ξεπαγώνετε επανειλημμένα τα δείγματα.

Αποφύγετε τον προσδιορισμό λιπαιμικών, ικτερικών ή αιμολυόμενων δειγμάτων.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Κιτ για τον προσδιορισμό της ανασταλίνης A: 96 βυθίσματα (αρ. καταλόγου DSL-10-28100T-1)

Επικαλυμμένες ταινίες με αντίσωμα αντι-ανασταλίνης A: Μια βάση ταινιών που περιέχει 96 βυθίσματα μικροπιλοδότησης.

Βυθίσματα μικροπιλοποίησης πολυστυρενίου με αντι-ανασταλίνη β_A ακινητοποιημένα στο εσωτερικό τοίχωμα κάθε βυθίσματος.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης στο επανασφραγισμένο θύλακα με ξηραντικό υλικό για προστασία από την υγρασία.

Συμπύκνωμα συζεύγματος αντισώματος-ενζύμου ανασταλίνης A: ένα φιαλίδιο των 0,6 mL

Σύζευγμα μονοκλωνικού αντισώματος HRP ποντικού αντι-ανασταλίνης α-υποομάδας, MOPSO, BSA και < 1,0% ProClin** 300.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Αραιώστε πριν από τη χρήση σε αραιωτικό συζεύγματος.

Βαθμονομητές: έξι φιαλίδια του 1 mL και ένα φιαλίδιο των 2 mL του «μηδενικού» βαθμονομητή (έτοιμα προς χρήση)

Συγκεντρώσεις περίπου 0, 10, 30, 100, 250, 500 και 1.000 pg/mL ανασυνδυασμένης διμερούς ανασταλίνης A σε ορό βόειας προέλευσης με <0,5% ProClin 300.

Ανατρέξτε στις ετικέτες του φιαλιδίου για τις ακριβείς συγκεντρώσεις.

Φυλάξτε κλειστό στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Σταθερό σε θερμοκρασία 2 έως 8 °C για 28 ημέρες μετά την αρχική χρήση. Για μεγαλύτερες περιόδους, φυλάσσετε σε καταψύκτη –20 °C (–15 °C έως –24 °C) μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Η μετρούμενη ουσία (αναλυόμενη ουσία) στα βαθμονομητές της ανασταλίνης A ιχνηλατείται σύμφωνα με το 1ο Διεθνές πρότυπο του ΠΟΥ για την Ανασταλίνη A (κωδικός 91/624) που περιέχει ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ανασταλίνη A 32 kDa (1 pg/mL ή 0,037 IU/mL). Οι εκχωρημένες τιμές υπολογίστηκαν με βάση αντιπροσωπευτικά δείγματα από αυτήν την παρτίδα προτύπων και είναι χαρακτηριστικές της μεθοδολογίας προσδιορισμού των αντιδραστηρίων. Οι τιμές που καθορίζονται με άλλες μεθοδολογίες ενδέχεται να είναι διαφορετικές. Οι διαφορές αυτές, εάν υπάρχουν, ενδέχεται να οφείλονται σε συστηματικά σφάλματα μεταξύ των μεθόδων.

Μάρτυρες: Δύο φιαλίδια του 1,0 mL (έτοιμα για χρήση)

Χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης διμερούς ανασταλίνης A σε ορό βόειας προέλευσης με <0,5% ProClin 300.

Οι αναμενόμενες τιμές κυμαίνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων που αναγράφονται σε συμπληρωματικό φυλλάδιο.

Φυλάξτε κλειστό στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Σταθερό σε θερμοκρασία 2 έως 8 °C για 28 ημέρες μετά την αρχική χρήση. Για μεγαλύτερες περιόδους, φυλάσσετε σε καταψύκτη –20 °C (–15 °C έως –24 °C) μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος A: Μία φιάλη των 10,0 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα με αλβουμίνη ορού βόειας προέλευσης (BSA), ορό ζωικής προέλευσης (αίγα, ποντίκι), επιφανειοδραστικό και αζίδιο του νατρίου.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος B: Μία φιάλη των 10,0 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα με <20% υπεροξειδίου υδρογόνου ουρίας, < 0,5% ProClin 300 και αζίδιο νατρίου.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Διάλυμα χρωμογόνου TMB: Μία φιάλη των 11,0 mL

Τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα με υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Διάλυμα αναστολής A: Μία φιάλη των 11,0 mL

0,2 M θειικό οξύ.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C ή σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Αραιωτικό συζεύγματος: Μία φιάλη των 15,0 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα με BSA, ορό ζωικής προέλευσης (αίγα, ποντίκι), επιφανειοδραστικό και <1,0% ProClin 300.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Διάλυμα πλύσης U (20x): Ένα φιαλίδιο 50 mL

Το συμπυκνωμένο διάλυμα πρέπει να αραιωθεί πριν από τη χρήση.

Φυλάξτε στους 2 έως 8 °C ή σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Κιτ για τον προσδιορισμό της ανασταλίνης A: 384 βυθίσματα (αρ. καταλόγου DSL-10-28100T-4)

Επικαλυμμένες ταινίες με αντίσωμα αντι-ανασταλίνης A: Τέσσερις βάσεις ταινιών, έκαστη με 96 βυθίσματα μικροπιλοδότησης.

Συμπύκνωμα συζεύγματος αντισώματος-ενζύμου ανασταλίνης A: Τέσσερα φιαλίδια των 0,6 mL

Βαθμονομητές: Δώδεκα φιαλίδια του 1 mL και δύο φιαλίδια των 2 mL του «μηδενικού» βαθμονομητή (έτοιμα προς χρήση)

Οροί ελέγχου: Τέσσερα φιαλίδια του 1,0 mL (έτοιμα για χρήση)

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος A: Τέσσερις φιάλες των 10,0 mL

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος B: Τρεις φιάλες των 10,0 mL

Διάλυμα χρωμογόνου TMB: Μία φιάλη των 50,0 mL

Διάλυμα αναστολής A: Τέσσερις φιάλες των 11,0 mL

Αραιωτικό συζεύγματος: Τέσσερις φιάλες των 15,0 mL

Διάλυμα πλύσης (20x): 2 φιαλίδια των 50 mL

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Ο απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός, επιπλέον του συνήθους, είναι ο εξής:

- Συσκευή ανάγνωσης πλάκας μικροπιλοδότησης ικανή για μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm και κατά προτίμηση ικανή για διόρθωση διπλού μήκους κύματος μεταξύ των 600 και 630 nm
- Απιονισμένο νερό
- Πιπέτα ακριβείας για τη χορήγηση 50–100 μL
- Αναδευτήρας πλάκας μικροπιλοδότησης ικανός για 500–700 περιστροφές τροχιάς ανά λεπτό (rpm)
- Συσκευή πλύσης πλάκας μικροπιλοδότησης
- Αναμίκτης Vortex
- Απορροφητικά υλικά για στέγνωμα των λωρίδων
- Χαρτί γραφικών για μη αυτόματη αναγωγή δεδομένων

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

- Η λεπτομερής κατανόηση αυτού του ένθετου συσκευασίας είναι απαραίτητη για την επιτυχή χρήση της μεθόδου ELISA ανασταλίνης A.
- Η επικύρωση του προσδιορισμού για χρήση αποτελεί ευθύνη του πελάτη.
- Αξιόπιστα αποτελέσματα λαμβάνονται μόνο με τη χρήση εργαστηριακών τεχνικών ακριβείας και την ορθή τήρηση του ένθετου συσκευασίας.
- Κάνετε ταυτόχρονα την πρότυπη καμπύλη και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.
- Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια του κιτ να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση.

- Αναμείξτε καλά τα αντιδραστήρια πριν από τη χρήση ανακινώντας ήπια.
- Μην αναμιγνύετε διαφορετικές παρτίδες οποιουδήποτε συστατικού του κιτ εντός ενός ξεχωριστού προσδιορισμού.
- Μη χρησιμοποιείτε οποιουδήποτε αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του.
- Η ανεπαρκής πλύση θα επηρεάσει αρνητικά την έκβαση και την ακρίβεια του προσδιορισμού.
- Για την ελαχιστοποίηση πιθανής παρέκκλισης του προσδιορισμού εξαιτίας διαφορών στο χρόνο επώασης του υποστρώματος, πρέπει να φροντίζετε ώστε να προσθέτετε το ανασχετικό διάλυμα στα πηγάδια με την ίδια σειρά και ταχύτητα που χρησιμοποιήσατε για την προσθήκη του διαλύματος χρωμογόνου TMB.
- Κατά τον χειρισμό όλων των αντιδραστηρίων απαιτείται προσοχή, ώστε να αποφεύγεται η εισαγωγή μικροβιακών μολυσματικών ουσιών που μπορούν να βλάψουν τα αντιδραστήρια, ειδικά το αραιωτικό συζεύγματος και το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος A.
- Αποφύγετε τη μόλυνση του διαλύματος χρωμογόνου TMB με τα συζυγή.
- Χρησιμοποιήστε καθαρό αναλύσιμο ρύγχος πιπέτας για κάθε αντιδραστήριο, βαθμονομητή, μάρτυρα ή δείγμα.
- Για τη διανομή θειικού οξέος και διαλύματος χρωμογόνου TMB, αποφεύγετε τις πιπέτες με μεταλλικά μέρη.
- Το ένζυμο που χρησιμοποιείται ως επισήμανση απενεργοποιείται με το οξυγόνο και είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε μικροβιακή μόλυνση, αζίδιο του νατρίου, υποχλωριώδες οξύ και αρωματικούς χλωροϋδρογονάνθρακες που συναντώνται στην εργαστηριακή παραγωγή νερού.
- Να χρησιμοποιείτε απιονισμένο νερό.
- Αποφύγετε την έκθεση των αντιδραστηρίων σε υπερβολική θερμότητα ή άμεση ηλιοβολή κατά τη φύλαξη και επώαση.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. **Διάλυμα πλύσης:** Εγχύστε το περιεχόμενο του φιαλιδίου σε 950 mL απεσταγμένου νερού και ομογενοποιήστε. Το αραιωμένο διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 18–25 °C για ένα μήνα ή στους 2–8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ.
2. **Συζυγές διάλυμα αντισωμάτων-ενζύμων Inhibin A:** Το συζυγές συμπύκνωμα αντισωμάτων-ενζύμων Inhibin A θα πρέπει να αραιώνεται σε αναλογία 1 μέρους σε 50 μέρη του συζυγούς διαλύματος Inhibin A, ανάλογα με τον αριθμό των χρησιμοποιούμενων πηγαδίων. Για μία ολόκληρη πλάκα, μεταφέρετε με πιπέτα ακριβώς 220 μL από το συζυγές συμπύκνωμα αντισωμάτων-ενζύμων Inhibin A σε 11 mL συζυγούς διαλύματος.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το συζυγές συμπύκνωμα αντισωμάτων-ενζύμων Inhibin A θα πρέπει να είναι πρόσφατα αραιωμένο, 10-15 λεπτά πριν από τη χρήση.
3. **Πηγάδια μικροπιλοδότησης:** Επιλέξτε τον αριθμό των επικαλυμμένων πηγαδίων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό. Τα υπόλοιπα αχρησιμοποίητα πηγάδια πρέπει να τοποθετηθούν στο επανασφραγισμένο θύλακα με ξηραντικό υλικό. Ο θύλακας πρέπει να επανασφραγιστεί για προστασία από την υγρασία.

Διαδικασία εξέτασης

Αφήστε όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C). Αναμίξτε καλά τα αντιδραστήρια πριν από τη χρήση ανακινώντας ήπια. Μετά την ανασύσταση των αντιδραστηρίων, αναμίξτε καλά, αποφεύγοντας το σχηματισμό αφρού. Τα βαθμονομητές, οι Δεδομένα και τα δείγματα πρέπει να προσδιορίζονται εις διπλούν.

1. Σημειώστε τις λωρίδες μικροπιλοδότησης που θα χρησιμοποιηθούν.
2. Μεταφέρετε με πιπέτα 50 μL των βαθμονομητές, μαρτύρων και δειγμάτων στα κατάλληλα πηγάδια.
3. Προσθέστε 50 μL του ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος A σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας πιπέτα ακριβείας.
4. Προσθέστε 50 μL του ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος B σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας πιπέτα ακριβείας.
5. Επώαστε τα πηγάδια, με ανάδευση στις 500–700 rpm σε τροχιακό αναδευτήρα μικροπλάκας, για τρεις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).
6. Ετοιμάστε το συζυγές διάλυμα αντισωμάτων-ενζύμων αραιώνοντας το συζυγές συμπύκνωμα αντισωμάτων-ενζύμων στο Αραιωτικό

συζεύγματος Inhibin A όπως περιγράφεται στην ενότητα "Προετοιμασία αντιδραστηρίου" του παρόντος ένθετου συσκευασίας.

- Εκτελέστε αναρρόφηση και πλύση κάθε πηγαδιού έξι φορές με το διάλυμα πλύσης χρησιμοποιώντας αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας ή χειροκίνητα χρησιμοποιώντας πιπέτα ακρίβειας. Χτυπήστε απαλά και στεγνώστε αναστρέφοντας την πλάκα σε απορροφητικό υλικό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η χρήση αυτόματης συσκευής πλύσης μικροπλάκας συνιστάται ιδιαίτερα. Η ατελής πλύση θα επηρεάσει δυσμενώς την ακρίβεια του προσδιορισμού. Εάν δεν διατίθεται συσκευή πλύσης μικροπλάκας, για τη χειροκίνητη πλύση της πλάκας εκτελέστε τα εξής βήματα:

- Αναρροφήστε πλήρως το υγρό από κάθε πηγάδι
 - Διανείμετε 350 µL του διαλύματος πλύσης σε κάθε πηγάδι χρησιμοποιώντας πιπέτα ακρίβειας
 - Αναρροφήστε ξανά το υγρό
 - Επαναλάβετε τα βήματα (b) και (c) πέντε φορές
- Προσθέστε 100 µL διαλύματος συζυγούς αντισώματος-ενζύμων σε κάθε πηγάδι χρησιμοποιώντας πιπέτα ακρίβειας.
 - Επώαστε τα πηγάδια, με ανάδευση στις 500–700 rpm σε τροχιακό αναδευτήρα μικροπλάκας, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).
 - Εκτελέστε αναρρόφηση και πλύση κάθε πηγαδιού έξι φορές με το διάλυμα πλύσης χρησιμοποιώντας αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας. Χτυπήστε απαλά αναστρέφοντας την πλάκα σε απορροφητικό υλικό.
 - Προσθέστε 100 µL διαλύματος χρωμογόνου TMB σε κάθε πηγάδι χρησιμοποιώντας πιπέτα ακρίβειας.

Αποφύγετε την έκθεση στην άμεση ηλιοβολή.

- Επώαστε τα πηγάδια, με ανάδευση στις 500–700 rpm σε τροχιακό αναδευτήρα μικροπλάκας, για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Να γνωρίζετε ότι το χρώμα μπορεί να αναπτυχθεί πιο γρήγορα ή πιο αργά σε σχέση με το συνιστώμενο χρόνο επώασης ανάλογα με την τοπική θερμοκρασία δωματίου. Να παρακολουθείτε οπτικά την ανάπτυξη του χρώματος για τη βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης.

- Προσθέστε 100 µL ανασχετικού διαλύματος σε κάθε πηγάδι χρησιμοποιώντας πιπέτα ακρίβειας.
- Εκτελέστε ανάγνωση της απορρόφησης του διαλύματος στα βυθίσματα εντός 30 λεπτών χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων ρυθμισμένη στα 450 nm.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ:

- Κατά την ανάγνωση της απορρόφησης του πηγαδιού μικροπιλοδοτήσης, πρέπει να προγραμματίσετε το μηδενικό Βαθμονομητής ως "Τυφλό".
- Εάν διατίθεται διόρθωση μήκους κύματος, ρυθμίστε το όργανο σε μέτρηση διπλού μήκους κύματος στα 450 nm με τη διόρθωση μήκους κύματος υποβάθρου ρυθμισμένη μεταξύ 600 και 630 nm.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Υπολογίστε τη μέση απορρόφηση για κάθε βαθμονομητής, μάρτυρα ή δείγμα.
- Καταγράψτε σε γραφική παράσταση τις μετρήσεις μέσης απορρόφησης για κάθε ένα από τα πρότυπα κατά μήκος του άξονα y έναντι των συγκεντρώσεων της ανασταλτίνης A σε pg/mL κατά μήκος του άξονα x, χρησιμοποιώντας μια γραμμική καμπύλη προσαρμογής. Εναλλακτικά, τα δεδομένα μπορούν να καταγραφούν γραμμικά έναντι γραμμικών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια ομαλοποιημένη καμπύλη προσαρμογής μοντέλου «spline».
- Σχεδιάστε την καλύτερη καμπύλη προσαρμογής μέσω της μέσης τιμής των διπλών σημείων.
- Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις ανασταλτίνης A των μαρτύρων και των δειγμάτων από την πρότυπη καμπύλη αντιστοιχίζοντας τις μέσες τιμές απορρόφησης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις ανασταλτίνης A.
- Οποιαδήποτε μέτρηση δείγματος υψηλότερη από το υψηλότερο βαθμονομητής θα πρέπει να αραιώνεται κατάλληλα με χρήση του Βαθμονομητής 0 ανασταλτίνης A και να επαναβεβαιώνεται.
- Κάθε δείγμα με τιμή χαμηλότερη από την αναλυτική ευαισθησία πρέπει να αναφέρεται ανάλογα.

7. Πολλαπλασιάστε την τιμή με συντελεστή αραιώσης, εάν απαιτείται.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Εάν οι μετρήσεις απορρόφησης υπερβαίνουν τους περιορισμούς της συσκευής ανάγνωσης πλάκας, απαιτείται δεύτερη ανάγνωση στα 405 nm (φίλτρο αναφοράς μεταξύ των 600 και 630 nm, εάν υπάρχει). Σε αυτή την περίπτωση, προχωρήστε στην κατασκευή μιας δεύτερης τυπικής καμπύλης όπως παραπάνω, με τις αναγνώσεις απορρόφησης όλων των βαθμονομητές στα 405 nm. Η συγκέντρωση των δειγμάτων εκτός κλίμακας στα 450 nm διαβάζεται κατόπιν από τη νέα πρότυπη καμπύλη. Οι αναγνώσεις στα 405 nm δεν πρέπει να αντικαθιστούν τις αναγνώσεις εντός κλίμακας στα 450 nm.

Πρότυπη καμπύλη

Βαθμονομητές	συγκέντρ. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Τυφλό)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης, να μη χρησιμοποιηθεί για τους υπολογισμούς).

Δείγματα

Για τη μετατροπή από IU/mL, χρησιμοποιήστε την ακόλουθη εξίσωση:

$$1 \text{ IU/mL (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίσει τα δικά του εύρη αναφοράς, προκειμένου να εξασφαλίσει τη σωστή αντιπροσώπευση συγκεκριμένων πληθυσμών. Οι ακόλουθες τιμές που παρουσιάζονται λήφθηκαν με ELISA ανασταλτίνης A με χρήση δειγμάτων ορού από φαινομενικά υγιείς ενήλικες. Όλες οι τιμές αναφέρονται σε pg/mL. Για τις γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, οι αριθμοί κάτω από κάθε φάση αντιπροσωπεύουν ημέρες πριν ή μετά την αύξηση LH.

Πληθυσμός	n	Μέσος	Διάμεσος	95% εύρος εμπιστοσύνης
Γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο				
Πρώιμη ωοθυλακική φάση (-14 έως -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Μεσοθυλακική φάση (-9 έως -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Τέλος θυλακική φάση (-3 έως -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Μέσα κύκλου (Ημέρα 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Αρχική ωοθηκών (1 έως 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Μέση ωοθηκών (4 έως 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Τελική ωοθηκών (12 έως 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Ανώτερα επίπεδα IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1.690
PCOS - Ωορρηκτική	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Μετά την εμμηνόπαυση	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Φυσιολογικοί άνδρες	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Οι τιμές ανασταλτίνης A που είναι χαμηλότερες από τον βαθμονομητή 1 υπολογίζονται με παρεκβολή.

Οι τιμές που παρέχονται στον ακόλουθο πίνακα αφορούν την ανασταλτίνη A μητρικού ορού στο δεύτερο τρίμηνο.

Ολοκληρωμένη εβδομάδα	Αρ. δειγμάτων	Μέση ανασταλτίνη (pg/mL)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Πίνακας προσαρμοσμένος από τιμές που παρασχέθηκαν από κέντρο προκαταρκτικού ελέγχου των ΗΠΑ (2005).

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

- Οι μάρτυρες ELISA της ανασταλίνης A ή άλλοι εμπορικά διαθέσιμοι μάρτυρες πρέπει να εμπίπτουν σε καθορισμένα όρια εμπιστοσύνης.
- Τα όρια εμπιστοσύνης για τους μάρτυρες ELISA της ανασταλίνης A έχουν εκτυπωθεί στις συμπληρωματικό φυλλάδιο.
- Σε κάθε ανάλυση πρέπει να περιλαμβάνεται μια πλήρης πρότυπη καμπύλη, συν μάρτυρες χαμηλού και υψηλού επιπέδου.
- Το διάλυμα χρωμογόνου TMB πρέπει να είναι άχρωμο έως πολύ ανοικτό κίτρινο. Η ανάπτυξη μπλε χρώματος μπορεί να υποδεικνύει μόλυνση ή αστάθεια αντιδραστήριου.
- Τα υλικά ποιοτικού ελέγχου προσομοιώνουν τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων ασθενών και είναι απαραίτητα για την παρακολούθηση της απόδοσης του συστήματος των ανοσοχημικών αναλύσεων. Συμπεριλαμβάνετε υλικό ποιοτικού ελέγχου (QC) ή άλλα υλικά ποιοτικού ελέγχου του εμπορίου που καλύπτουν τουλάχιστον δύο επίπεδα της αναλυόμενης ουσίας. Η πιο συχνή χρήση μαρτύρων ή η χρήση πρόσθετων μαρτύρων εναπόκειται στην κρίση του χρήστη με βάση τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές ή τις απαιτήσεις και τους ισχύοντες νόμους περί πιστοποίησης εργαστηρίων. Ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή όσον αφορά την ανασύσταση και τη φύλαξη. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίσει μέσες τιμές και αποδεκτά όρια για τη διασφάλιση της σωστής απόδοσης. Τα αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου που δεν εμπίπτουν στα αποδεκτά εύρη μπορεί να υποδηλώνουν μη έγκυρα αποτελέσματα εξέτασης.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

(βλέπε τη σελίδα "APPENDIX" για περισσότερες λεπτομέρειες)

Τα αντιπροσωπευτικά δεδομένα παρέχονται μόνο ως παράδειγμα. Η απόδοση που επιτυγχάνεται σε κάθε εργαστήριο μπορεί να διαφέρει.

Ευαισθησία

Όριο ανίχνευσης (OA): 2,61 pg/mL

Εξειδίκευση

Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στον ανοσοπροσδιορισμό είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο για την ανασταλίνη A.

Ακρίβεια

Εντός της δοκιμής

Διάφορα δείγματα εξετάστηκαν 25 φορές στην ίδια σειρά. Οι συντελεστές απόκλισης που προέκυψαν ήταν μικρότεροι ή ίσοι με 4,6% για τα δείγματα ορών.

Εκτός της δοκιμής

Τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν σε 10 διαφορετικές σειρές. Οι συντελεστές μεταβλητότητας βρέθηκαν να είναι κάτω από ή ίσοι με 6,9% για τα δείγματα ορού.

Ακρίβεια

Δοκιμή αραιώσης

Δείγματα υψηλής συγκέντρωσης αραιώθηκαν στο μηδενικό βαθμονομητο. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονται μεταξύ 97,8% και 117%.

Δοκιμή ανάκτησης

Τα δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης ενισχύθηκαν με γνωστές ποσότητες ανασταλίνης A. Τα ποσοστά ανάκτησης που λήφθηκαν ήταν μεταξύ 83,5% και 99,5%.

Εύρος μέτρησης (από το όριο ανίχνευσης έως τον υψηλότερο βαθμονομητή): 2,61 έως περίπου 1.000 pg/mL.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Τα αντιδραστήρια που παρέχονται με αυτό το κιτ είναι βελτιστοποιημένα για τη μέτρηση των επιπέδων ανασταλίνης A στον ορό ή στο πλάσμα.
- Για αναλύσεις που χρησιμοποιούν αντισώματα, υπάρχει πιθανότητα παρεμβολής από ετερόφιλα αντισώματα στο δείγμα. Τα δείγματα ατόμων που εκτίθενται συχνά σε ζώα ή έχουν λάβει ανοσοθεραπεία ή έχουν υποβληθεί σε διαγνωστικές επεμβάσεις στις οποίες χρησιμοποιούνται ανοσοσφαιρίνες ή τμήματα ανοσοσφαιρινών, ενδέχεται να παραγάγουν αντισώματα, π.χ. ανθρώπινα αντι-μυϊκά αντισώματα (HAMA), που προκαλούν παρεμβολή στους ανοσοπροσδιορισμούς. Στα δείγματα ενδέχεται να υπάρχουν και άλλα ετερόφιλα αντισώματα, όπως π.χ. αντισώματα ανθρώπου έναντι πρωτεϊνών αίγας.^{22,23} Τα εν λόγω παρεμβαλλόμενα αντισώματα πιθανόν να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Να αξιολογείτε προσεκτικά τα αποτελέσματα ασθενών που υποπτεύεστε ότι φέρουν αυτά τα αντισώματα.
- Αν υπάρχουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης ή υπερβολικής θολότητας σε ένα αντιδραστήριο, απορρίψτε το φιαλίδιο.
- Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού ανασταλίνης A ELISA, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η συνολική κλινική εικόνα του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων των συμπτωμάτων, του κλινικού ιστορικού, των δεδομένων πρόσθετων εξετάσεων και άλλων πληροφοριών που κρίνονται κατάλληλες.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

CSAK MEGFELELŐEN KÉPZETT SZAKEMBEREK HASZNÁLHATJÁK,

Az Inhibin A enzim-immunassay (ELISA) készlet az inhibin A dimer humán szérumban vagy plazmában történő kvantitatív méréséhez való eszközöket tartalmazza. A készlet kizárólag *in vitro* módon használható, különböző hormonális reprodukciós rendellenességek diagnosztizálásának és monitorozásának elősegítésére. Ezenkívül Down-szindróma (21-es triszómia) szűrésére is alkalmazható a 2. harmadban, biokémiai és ultrahangos markerekkel együtt használva, a kereskedelmi forgalomban kapható kockázatelemző szoftvereken által használt algoritmusok segítségével.^{24, 25} Határozottan javasoljuk, hogy a 21-es triszómia kockázatának értékeléséhez készült, hitelesített (CE-jelöléssel rendelkező) szoftvert használjon, pl az alpha szoftvert.* Az Inhibin A készlet a hAFP, a hCG és az uE3 vizsgálatokkal együtt való használatra szolgál.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az inhibinek heterodimer fehérjehormonok, amelyeket nőkben a petefészek granulosa-sejtjei, férfiakban a here Sertoli-sejtjei termelnek. Szelektíven gátolják a hypophysis folliculusstimuláló hormonjának (FSH) szekrécióját, és lokális parakrin hatást fejtenek ki a nemi szervekben.^{1,2}

Az inhibin molekula végső formájának molekulatömege körülbelül 32 kD, és két (alfa és béta) láncból áll, amelyeket diszulfidhidak kötnek össze. A tüszőfolydékban és a szérumban előfordulnak nagyobb molekulatömegű formák is, amelyek az alfa-alegység prekursor formáit tartalmazzák. Emellett előfordulnak az inhibinre jellemző biológiai hatással nem rendelkező, béta-alegység nélküli szabad alfa-alegységek is.^{3,4,5,6}

Az inhibin A egy alfa-alegységből és egy béta_A-alegységből áll. Az inhibin A mérése hasznosnak bizonyult az emberi reprodukcióban betöltött szerepének vizsgálatában.^{7,8,9} Számos közleményben rámutatnak az inhibin A mérések hasznosságára a petefészek-funkció követésére alkalmas markerként.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Egészen eddig nem lehetett megkülönböztetni egymástól a keringésben lévő dimerikus inhibint és a szabad alfa-alegységet a normál humán menstruációs ciklusban.

A pontosan ismert tulajdonságokkal rendelkező antitestekkel végzett két köthelyes szendvics ELISA azonban alkalmas a kifejezetten csak a dimerikus inhibin A mérésére.¹⁸

MŰKÖDÉSI ELV

Az Inhibin A ELISA egy enzimmel erősített kétlépéses „szendvics” vizsgálat. A vizsgálat során kalibrátorok, kontrollokat és mintákat inkubálunk mikrotitrációs üregekben, amelyek be vannak vonva anti-inhibin béta_A-alegység antitestekkel. Az inkubálás és leöblítés után torna-peroxidázzal (HRP) jelölt anti-inhibin alfa-alegység indikátor antitest hozzáadása történik minden üregbe. A második inkubálási és leöblítési lépés után tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrátot töltünk az üregekbe.

Végül savas leállító oldat hozzáadása történik. A szubsztrát enzimátikus átalakulási sebességének mérése kettős, 450 nm és 600–630 nm hullámhosszú abszorbanciaméréssel történik. A mért abszorbancia egyenesen arányos a minták inhibin A-koncentrációjával. Ezután egy sorozat Inhibin A kalibrátorok segítségével az abszorbancia és az inhibin A koncentrációja közötti összefüggést ábrázoló normál görbe meghatározása történik. A minták inhibin A-koncentrációját ezután ki lehet számítani ebből a görbéből.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

***In vitro* diagnosztikai használatra.**

Alkalmazza a helyes laboratóriumi gyakorlatot.¹⁹

A minták és a vérből származó termékek rutinszerűen feldolgozhatók az ismertetett eljárás segítségével, minimális kockázattal. Azonban az általános óvintézkedéseknek és a helyes klinikai laboratóriumi gyakorlatoknak megfelelően ezeket a termékeket kezelje potenciálisan fertőzésveszélyesként, tekintet nélkül az eredetükre, a kezelésükre és a korábbi minősítésekre.²⁰ Használjon megfelelő fertőtlenítőszerket a szennyeződések eltávolítására. Ezen anyagokat a helyi szabályozásoknak és irányelveknek megfelelően tárolja és semmisítse meg.

GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

Calibrators / Controls

FIGYELEM!



H317

Allergiás bőrreakciót válthat ki.

H412

Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

P273

Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

P280

Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.

P333+P313

Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P362+P364

Az szennyezett ruhadarabokat le kell vetni és használat előtt ki kell mosni. keveréke; 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1) keveréke <0,05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate

FIGYELEM!



H316

Enyhe bőrirritációt okoz.

H317

Allergiás bőrreakciót válthat ki.

H412

Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

P273

Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

P280

Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.

P332+P313

Bőrirritáció esetén: orvoshoz kell fordulni.

P333+P313

Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.

P362+P364

Az szennyezett ruhadarabokat le kell vetni és használat előtt ki kell mosni. 3-(N-morfolin)-2-hidroxi-propán szulfonsav, nátriumsó 1 - 2% keveréke; 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1) keveréke <0,05%

Sample Buffer A

VESZÉLY!



H316







Enyhe bőrirritációt okoz.

H318

Súlyos szemkárosodást okoz.

P280

Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Sample Buffer B	P305+P351+P338	SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.		H412	Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.
	P310	Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.		P273	Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.
	P332+P313	Bőrirritáció esetén: orvoshoz kell fordulni. Nátrium-lauril-szulfát 1 - < 3% Tris(hidroxi-metil)-aminomethane (amino-metán) 1 - 2% Alkohol, C12-14, szekunder, etoxilált 3 - 5%		P280	Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.
	VESZÉLY!			P305+P351+P338	SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
				P310	Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.
				P333+P313	Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.
	H314	Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.		P362+P364	Az szennyezett ruhadarabokat le kell vetni és használat előtt ki kell mosni. Tris(hidroxi-metil)-aminomethane (amino-metán) 1 - 3% Alkohol, C12-14, szekunder, etoxilált 3 - 5% keveréke; 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1) keveréke < 0,05%
	H317	Allergiás bőrreakciót válthat ki.			
	P280	Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.			
	P303+P361+P353	HA BÖRRE (vagy hajra) KERÜL: A bőrt le kell öblíteni vízzel.	Leállító oldat A	VESZÉLY!	
P305+P351+P338	SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.				
P310	Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.		H314	Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.	
P333+P313	Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.		P280	Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.	
P362+P364	Az szennyezett ruhadarabokat le kell vetni és használat előtt ki kell mosni. karbamid hidrogén peroxid 10 - 20% keveréke; 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1) keveréke < 0,05%		P301+P330+P331	LENYELÉS ESETÉN: a száját ki kell öblíteni. TILOS hánytatni.	
			P303+P361+P353	HA BÖRRE (vagy hajra) KERÜL: A bőrt le kell öblíteni vízzel.	
			P305+P351+P338	SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.	
			P310	Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Kénsav 1 - 3%	
Conjugate Diluent	VESZÉLY!	Wash solution (20x)	VESZÉLY!		
					
			H360	Károsíthatja a termékenységet és a születendő gyermeket.	
H316	Enyhe bőrirritációt okoz.		P201	Használat előtt ismerje meg a vizsgálatra vonatkozó különleges utasításokat.	
H317	Allergiás bőrreakciót válthat ki.				
H318	Súlyos szemkárosodást okoz.				

P280	Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P308+P313	Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni. Bórsav 0,1 - 0,3% Nátrium-borát dekahidrát 0,1 - 0,3%

SDS A biztonsági adatlap megtalálható a következő címen: beckmancoulter.com/techdocs

MINTAVÉTEL, FELDOLGOZÁS, TÁROLÁS ÉS HIGÍTÁS

Az ajánlott minták: szérum és plazma.

Tartsa be az alábbi, a vérminták kezelésére, feldolgozására, és tárolására vonatkozó javaslatokat:²¹

- A vénás vérvételre vonatkozó szokásos óvintézkedések figyelembevételével vegye le a vérmintákat.
- A mintavételi csöveket mindig dugaszolja be.
- A centrifugálás után két órán belül helyezzen át legalább 500 µL sejtmintes mintát egy tárolócsőbe. Azonnal szorosan dugaszolja be a mintacsövet.
- A hígítatlan vagy hígított minták szorosan lezárva, 2–8 °C-on legfeljebb 24 óráig tárolhatók.
- Ha a mérés nem történik meg 24 órán belül, vagy szállítani kívánja a mintákat, fagyassza legalább –20 °C-ra; a minták így 30 napig is elállnak.

A minták előkészítésekor az alábbi útmutatást kell követni:

- Győződjön meg róla, hogy a maradék fibrin és sejteket az elemzés megkezdése előtt eltávolította.
- Kövesse a vérmintavételi cső gyártójának utasításait a centrifugálásra vonatkozóan.

Minden laboratóriumnak meg kell határoznia a saját vérmintavételi csövei és szérum elkülönítő termékei elfogadhatóságát. Előfordulhatnak eltérések a különböző gyártóktól, és időnként a különböző tételekből származó termékek között is.

Lehetőleg kerüljük a minták ismételt kiolvasztását és visszafagyasztását.

Ne vizsgáljon lipémikus, ikterikus vagy hemolizált mintákat.

SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

Az inhibin A meghatározására szolgáló készlet: 96 üveg (katalógusszám: #DSL-10-28100T-1)

Anti-Inhibin A antitesttel bevont mikrotitrációs csík: Egy csíktartó, amely 96 mikrotitrációs üreget tartalmaz.

Polisztrén mikrotitrációs üregek, amelyek belső felszínéhez anti-inhibin béta_A van kötve.

Az újra lezárható tasakban a nedvesség ellen védő deszikkáns anyaggal 2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

Inhibin A-antitest-enzim konjugátum koncentrátum: egy 0,6 mL-es üveg

Inhibin-alfa-alegység elleni egér monoklonális antitest és HRP konjugátuma, MOPSO, BSA és < 1,0% ProClin** 300.

2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

Használat előtt hígítani kell konjugátum-hígítószerezrel.

Kalibrátorok: Hat darab 1 mL-es üveg és egy 2 mL-es, „nulla” kalibrátort tartalmazó üveg (használatra kész)

Kb. 0, 10, 30, 100, 250, 500 és 1000 pg/mL koncentrációjú rekombináns dimerikus inhibin A < 0,5%-os ProClin 300-at tartalmazó szarvasmarha-szérumban.

A pontos koncentrációk az üvegek címkéjén találhatók.

Felnyitás nélkül 2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

2–8 °C-on tárolva az első alkalmazás után 28 napig használható. Hosszabb időre –20 °C-os fagyasztoóban (–15 °C és –24 °C között) tárolható, a lejárati időig.

PI-DSL1028100T-04

Az Inhibin A kalibráló oldat a vizsgálandó anyag visszavezethető az Egészségügyi Világszervezet által készített Első nemzetközi szabványos inhibin A anyagra (kód: 91/624), amely 32 kDa molekulatömegű humán rekombináns inhibin A-t tartalmaz (1 pg/mL vagy 0,037 IU/mL). A standardhoz rendelt értékeket reprezentatív minták segítségével állapítottuk meg, és azok jellemzők a reagensek metodikájára. Ha megfigyelhetők ilyen különbségek, az a módszerek közötti torzítás miatt lehet.

Kontrollok: két 1,0 mL-es üveg (használatra kész)

Alacsony és magas koncentrációjú rekombináns inhibin A dimer < 0,5%-os ProClin 300-at tartalmazó szarvasmarha-szérumban.

A koncentrációtartományban megadott várt értékek a mellékletben találhatóak.

Felnyitás nélkül 2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

2–8 °C-on tárolva az első alkalmazás után 28 napig használható. Hosszabb időre –20 °C-os fagyasztoóban (–15 °C és –24 °C között) tárolható, a lejárati időig.

Mintapuffer A: Egy 10,0 mL-es palack

Puffer szarvasmarha-szérum albuminnal (BSA), állati szérummal (kecske, egér), felületaktív anyaggal és nátrium-aziddal.

2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

Mintapuffer B: Egy 10,0 mL-es palack

< 20% urea-hidrogén-peroxidot, < 0,5% ProClin 300-at és nátrium-azidot tartalmazó puffer.

2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

TMB kromogén oldat: Egy 11,0 mL-es palack

Tetrametil-benzidin (TMB) hidrogén-peroxidot tartalmazó citrát-pufferben.

2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

Leállító oldat A: Egy 11,0 mL-es palack

0,2 M kénsav.

2 és 8 °C közötti vagy szobahőmérsékleten (18-25°C) a lejárati dátumig tartható el.

Konjugátum-oldószer: Egy 15,0 mL-es palack

BSA-t, állati szérumot (kecske, egér), felületaktív anyagot és < 1,0% ProClin 300-at tartalmazó puffer.

2 és 8 °C közötti hőmérsékleten a lejárati dátumig tartható el.

Mosóoldat U (20 x): Egy 50 mL-es üveg

Koncentrált oldat, melyet használat előtt hígítani kell.

2 és 8 °C közötti vagy szobahőmérsékleten (18-25°C) a lejárati dátumig tartható el.

Az inhibin A meghatározására szolgáló készlet: 384 üveg (katalógusszám: #DSL-10-28100T-4)

Anti-Inhibin A antitesttel bevont mikrotitrációs csík: Négy csíktartó, egyenként 96 mikrotitrációs üreggel.

Inhibin A antitest-enzim konjugátum koncentrátum: négy 0,6 mL-es üveg

Kalibrátorok: tizenkét db 1 mL-es üveg és két db 2 mL-es, „nulla” kalibrátort tartalmazó üveg (használatra kész)

Kontrollszérumok: négy darab 1,0 mL-es üveg (használatra kész)

Mintapuffer A: Négy 10,0 mL-es palack

Mintapuffer B: Három 10,0 mL-es üveg

TMB kromogén oldat: Egy 50,0 mL-es palack

Leállító oldat A: Négy 11,0 mL-es palack

Konjugátum-oldószer: Négy 15,0 mL-es palack

Mosóoldat (20 x): két 50 mL-es üveg

SZÜKSÉGES, DE NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

A standard laboratóriumi felszerelésen kívül az alábbiak szükségesek:

- Mikrotitertálca-leolvasó, amely alkalmas az abszorbancia mérésére 450 nm-en és lehetőleg a 600 és 630 nm közötti kettős hullámhossz korrekcióra is
- Loncserélt víz
- 50–100 µL adagolására alkalmas precíziós pipetta

- Mikrotiter tálcázó, amely képes percenkénti 500–700 orbitális fordulatra (rpm)
- Mikroitrációs lemezmosó
- Vortex keverő
- Nedvszívó anyag a csíkok felitatásához
- Milliméterpapír a kézi adatredukcióhoz

ELJÁRÁS

AZ ELJÁRÁSHOZ FÜZÖTT MEGJEGYZÉSEK

- Az Inhibin A ELISA vizsgálat sikeres használatához alaposan át kell tanulmányozni a mellékelt tájékoztatót.
- A teszt validálása a felhasználó feladata.
- Csak precíz laboratóriumi technológia alkalmazásával és a teszthez kapott tájékoztató pontos követésével kaphatunk megbízható eredményeket.
- Minden vizsgálathoz készítsen standardgörbét.
- Használat előtt a minden reagensnek szobahőmérsékletű legyen (18-25°C).
- Felhasználás előtt az reagenseket, az üvegek óvatos felfordításával alaposan keverjük fel.
- Egy mérés során ne keverjünk eltérő gyártási tételeket egyik reagens esetében sem.
- A címkén látható lejárati időn túl egyik összetevőt se használjuk fel.
- A nem teljesen gondos mosás az eredményt és a mérés pontosságát előnytelenül érintheti.
- Nagyon nagy gondot kell rá fordítani arra, hogy a leállító oldatot ugyanolyan sorrendben és időben adagoljuk a mélyedésekhez, mint ahogyan korábban a TMB kromogén oldattal tettük, így elkerülhetjük a szubsztrátum inkubációs időben történt változások okozta mérési eredmény pontatlanságát.
- Mindegyik reagenst óvatosan kell kezelni a mikroórákkal való szennyeződés elkerülése érdekében, mert az károsíthatja a reagenseket, különösen a konjugátum-hígítószeret és a mintapuffer A-t.
- Kerüljük a TMB kromogén oldat szennyeződését a konjugátumokkal.
- Minden reagens, kalibráló oldat, kontroll oldat és minta beméréséhez tiszta, egyszer használatos pipetta hegyeket használjunk.
- A kénsav és TMB kromogén oldat adagolásához ne használjunk fém alkatrészeket is tartalmazó pipettákat.
- A jelölésnek használt enzimet oxigénnel inaktiválták, és igen érzékeny a mikroorganizmusokkal való szennyeződésre, nátrium azidra, hipoklórsavra és aromás klorofluorokarbonokra, amelyek gyakran előfordulnak a laboratórium vizében.
- Használjunk ionmentesített vizet.
- A reagenseket tárolás és inkubálás alatt lehetőleg ne érje túl nagy hő vagy közvetlen napfény.

A reagensek előkészítése

1. **Mosóoldat:** Öntse az üveg tartalmát 950 mL desztillált vízbe, majd homogenizálja. A hígított oldat 18–25 °C-on tárolható egy hónapig vagy 2–8 °C-on a készlet lejárati dátumáig.
2. **Inhibin A antitest-enzim konjugált oldat:** Az Inhibin A antitest-enzim Konjugátum koncentrátumot 1–50 arányban kell hígítani Inhibin A Konjugátum-oldószerezrel, a használt lyukak számának megfelelően. Egy egész tálcá esetében pipettázzon pontosan 220 µL Inhibin A antitest-enzim Konjugátum koncentrátumot 11 mL Konjugátumoldószerezbe.
MEGJEGYZÉS: Az Inhibin A antitest-enzim Konjugátum koncentrátumot frissen, a használat előtt 10–15 perccel kell felhígítani.
3. **Mikrotitráló mélyedések:** Válasszunk ki a vizsgálathoz szükséges számú, bevonattal ellátott mélyedést. A fennmaradó, fel nem használt mélyedéseket deszikkáns anyag jelenlétében vissza kell rakni az újra lezárható tasakba. A tasakot le kell zárni, hogy a nedvesség ne tudjon behatolni.

A vizsgálat menete

Várja meg, hogy valamennyi minta és reagens elérje a szobahőmérsékletet (18-25°C). Használat előtt keverje össze a reagenseket az ampullák megforgatásával. A reagensek rekonstitúciója után keverje össze őket alaposan, ügyelve rá, hogy ne habosodjanak fel. A kalibrátorok, Kontrollat és mintákat duplikálva kell megvizsgálni.

1. Jelöljük meg, melyik mikrotitráló csíkot kell használni.
2. Pipettázzon 50 µL kalibrátorok, kontrollt és mintát a megfelelő lyukakba.
3. Precíziós pipetta segítségével adjon mindegyik üregbe 50 µL mintapuffer A-t.
4. Precíziós pipetta segítségével adjon mindegyik üregbe 50 µL mintapuffer B-t.
5. Inkubálja a lyukakat, rázza fel őket 500–700-as rpm-en (fordulaton) egy orbitális mikrotálca-rázon három órán keresztül, szobahőmérsékleten (18-25°C).
6. Készítse el az antitest-enzim konjugált oldatot úgy, hogy felhígítja az antitest-enzim Konjugátum koncentrátumot az Inhibin A Konjugátumoldószerezben az „A reagensek előkészítése” c. fejezetben ismertetettek szerint.
7. Szívja és öblítse ki a lyukakat hatszor az öblítő oldattal egy automatikus mikrotányér-öblítő segítségével vagy kézzel, egy precíziós pipetta segítségével. Itassa fel és szárítsa ki a lyukakat abszorbeáló anyag segítségével.

MEGJEGYZÉS: Javasoljuk az automatikus mikrotálca-öblítő használatát. A nem tökéletes leöblítés negatív hatással van a vizsgálat pontosságára. Ha mikrotálca-öblítő nem áll rendelkezésre, az alábbiak szerint eljárva öblítse le a tálcákat saját kezűleg:

(a) Szívja ki teljesen a folyadékot a lyukakból

(b) Egy precíziós pipetta segítségével juttasson 350 µL öblítő oldatot minden egyes lyukba

(c) Szívja ki ismét a folyadékot

(d) Ismétlje meg a (b) és (c) lépést még ötször

8. Adjon 100 µL antitest-enzim konjugált oldatot az egyes lyukakba egy precíziós pipetta segítségével.
9. Inkubálja a lyukakat, rázza fel őket 500–700-as rpm-en (fordulaton) egy orbitális mikrotányér-rázon egy órán keresztül, szobahőmérsékleten (18- 25°C).
10. Szívja és öblítse ki a lyukakat hatszor az öblítő oldattal egy automatikus mikrotálca-öblítő segítségével. Itassa fel és szárítsa ki a lyukakat abszorbeáló anyag segítségével.
11. Adjon 100 µL TMB kromogén oldatot az egyes lyukakba egy precíziós pipetta segítségével.

Ne tegyük ki közvetlen napfény hatásának.

12. Inkubálja a lyukakat, rázza fel őket 500–700-as rpm-en (fordulaton) egy orbitális mikrotányér-rázon 15 percen keresztül, szobahőmérsékleten (18-25°C).

MEGJEGYZÉS: Az adott szobahőmérséklettől függően előfordulhat, hogy a szín sokkal gyorsabban vagy lassabban is kialakul az ajánlott inkubálási időhöz képest. Ezért az inkubálási idő optimalizálása érdekében kísérje figyelemmel a szín kialakulását.

13. Adjon 100 µL leállító oldatot az egyes lyukakba egy precíziós pipetta segítségével.

14. Olvassa le a cellákban lévő oldat abszorbanciáját 30 percen belül, 450 nm-re beállított microplate olvasóval.

MEGJEGYZÉS:

1) A mikrotálcs lyukak abszorpciós tulajdonságának leolvasása közben a nulla kalibrátor „üres”-re kell állítani.

2) Ha rendelkezésre áll hullámhossz-korrektió, állítsa a készüléket kétféle hullámhosszú üzemmódra: 450 nm-es mérésre, a háttérben 600 és 630 nm közötti hullámhossz-korrektióval.

EREDMÉNYEK

1. Számítsa ki a kalibrátor, kontrollok vagy minták abszorpciójának középértékét.
2. Ábrázolja a kalibrátor átlagos abszorbanciájának a logaritmusát az y-tengelyen, az inhibin A koncentrációjának logaritmusát pg/mL-ben

pedig az x-tengelyen, és illesszen hozzá egy lineáris görbét. Másik megoldásként az adatok lineáris-lineáris és simított spline görbeállításával is ábrázolhatók.

- Rajzolja fel a legjobban illeszkedő görbét a két értéken elhelyezkedő pontok középértéke mentén.
- Állapítsa meg a kontrollok és minták inhibin A koncentrációját a normál görbe alapján úgy, hogy a görbén az átlagos abszorbancia-értéknek megfelelő helyen leolvassa az inhibin A-koncentrációt.
- Ha egy minta értéke magasabb, mint a legmagasabb értékű kalibrátor, megfelelően hígítani kell az Inhibin A Kalibrátor 0-val, és meg kell ismételni a vizsgálatot.
- Az analitikai érzékenységi határnál alacsonyabb leolvasott értéket annak megfelelően kell kezelni.
- Az eredményt szükség esetén egy hígítási tényezővel kell beszorozni.

MEGJEGYZÉS: Ha az abszorbancia értéke meghaladja a tálcakezelés határértékeit, akkor szükség van egy második mérésre is, amelyet 405 nm-en kell elvégezni [referenciaszűrő (ha van): 600–630 nm között]. Ez esetben készíteni kell egy új normál görbét a fent leírt módon, az abszorbanciaértékeket 405 nm-en mérve. A 450 nm-en meghatározott mérési tartományon kívül eső minták koncentrációja leolvasható az új normál görbéről. A 450 nm-en leolvasott, méréstartományon belüli értékeket nem írják felül a 405 nm-en leolvasott értékek.

Standard görbe

Kalibrátorok	Konc. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Üres)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(A megadott standard görbe csak minta: konkrét számításokhoz nem használható)

Minták

Az IU/mL mértékegységre történő átváltáshoz használja a következő egyenletet:

$$1 \text{ IU/mL (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

Minden laboratóriumnak meg kell határozni a saját referenciatartományát az egyes populációk megfelelő ábrázolása érdekében. A következő értékeket mértük az Inhibin A ELISA használatával, látszólag egészséges felnőttek szérumszintjének vizsgálatával. Az összes érték mértékegysége pg/mL. A normálisan menstruáló nők esetén az egyes fázisok melletti számok az LH-csúcs előtti és utáni napokat jelentik.

Populáció	n	Közép	Közép- pérték	95%-os konfidencia- intervallum
Normál ciklusú nők				
Korai folliculáris fázis (-14-tl -10-ig)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Középső folliculáris fázis (a -9. naptól a -4. napig)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Késői follicularis fázis (a -3. naptól a -1. napig)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Középidő (0. nap)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Korai luteális fázis (1-3. napig)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Középső luteális fázis (4-11. nap)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Késői luteális fázis (12-14. nap)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
IVF esetén mért csúcshinték	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1690
PCOS, az ovuláció ideje körül	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Menopauza után	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Egészséges férfiak	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Az 1-es kalibrátor értékénél alacsonyabb inhibin A-értékek extrapolált értékek.

A következő táblázatban bemutatott értékek a terhesség második harmadában lévő anyák szérumban lévő inhibin A koncentrációjára vonatkoznak.

Befejezett hét	Minták száma	Inhibin A medián értéke (pg/mL)	LOG ₁₀ szórási
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

A táblázatban bemutatott adatokat egy egyesült államokbeli szűrési központ biztosította (2005-ben).

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

- Az Inhibin A ELISA kontrollok és az egyéb kereskedelmi forgalomban kapható kontrollok értékének a meghatározott konfidenciatartományba kell esnie.
- Inhibin A ELISA kontrollok a koncentrációtartományban megadott várt értékek a mellékletben találhatóak.
- Mindegyik teszt során mérni kell egy teljes normál görbe meghatározásához szükséges mintákat, és egy, a méréstartománytól alacsonyabb értékű és egy magasabb értékű kontrollt is.
- A TMB kromogén oldatnak színtelennek vagy egészen halvány sárgának kell lennie. Kék szín megjelenése a reagens szennyeződését vagy instabilitását jelentheti.
- A minőség-ellenőrzési anyagok szimulálják a betegek mintáinak tulajdonságait, és nélkülözhetetlenek az immunkémiai mérések teljesítményének követéséhez. Alkalmazzon legalább kétféle analitikoncentrációjú QC vagy más, a kereskedelemben kapható kontrollanyagot. A kontrollok gyakoribb használatáról, valamint további kontrollok alkalmazásáról a felhasználó belátása szerint dönthet, a helyes laboratóriumi gyakorlat vagy a laboratóriumi akkreditációs követelmények és a vonatkozó jogszabályok alapján. Kövesse a gyártó feloldásra és tárolásra vonatkozó utasításait. A megfelelő teljesítmény eléréséhez ajánlatos minden laboratóriumnak meghatározni a saját középértékeit és elfogadható értéktartományait. Az elfogadható tartományon kívül eső minőség-ellenőrzési eredményt azt jelentheti, hogy a teszt eredményei nem érvényesek.

MINŐSÉGI JELLEMZŐK

(További részletek a Mellékletben)

A reprezentatív adatok kizárólag szemléltető jellegűek. A különálló laboratóriumok eredményei ettől eltérhetnek.

Érzékenység

Kimutathatósági határérték (LoD): 2,61 pg/mL

Specifitás

Az immunassayben használt antitestek nagymértékben specifikusak az inhibin A-ra.

Pontosság

Intra-assay

Minták mérése történt ugyanabban a sorozatban 25-ször. A variációs koefficiens értéke szérumszintekre 4,6% vagy az alatti volt.

Inter-assay

Mintákat duplikátumban, 10 különböző sorozatban mértük. A variációs koefficiens szérumszintekre 6,9% vagy az alatti volt.

Valósság

Hígítási teszt

Magas koncentrációt tartalmazó mintákat sorozatosan hígítottak a zero kalibrátorral. A reprodukálhatósági arány 97,8–117% volt.

Visszanyerési teszt

Az alacsony koncentrációjú szérumszintekhez hozzáadtak ismert mennyiségű inhibin A-t. A reprodukálhatósági arány 83,5–99,5% volt.

Mérési tartomány (a kimutathatósági határértékétől és a legmagasabb koncentrációjú kalibrátor értékéig): 2,61 és körülbelül 1000 pg/mL között.

KORLÁTOZÁSOK

- A készletben mellékelt reagensek az inhibin A szintjének a szérumban vagy a plazmában való mérésére vannak optimalizálva.
- Antitesteket alkalmazó vizsgálatokban fennáll a minta heterofil antitestjei által okozott zavaró hatás lehetősége. Olyan személyekben, akik rendszeresen érintkeznek állatokkal, immunterápiában részesültek, vagy immunglobulinnal vagy immunglobulin-töredékekkel végzett diagnosztikai eljárásokban vettek részt, olyan állat elleni humán antitestek (például HAMA) termelődhetnek, amelyek zavarják az immunassayt. Ráadásul más heterofil antitestek, mint a humán anti-kecske antitestek is jelen

lehetnek a mintákban.^{22,23} Ezen antitestek hibás eredményeket okozhatnak. Körültekintően kell értékelni azon betegek eredményeit, akiknél ilyen antitest jelenlétének gyanúja merül fel.

- A reagens mikrobiális fertőzöttségére utaló jelek esetén vagy túl zavaros, akkor dobja ki az ampullát.
- Az Inhibin A ELISA vizsgálat eredményeit a páciens teljes klinikai kórképének ismeretében kell értelmezni, amelybe beletartoznak a tünetek, a kórtörténet, további vizsgálatok adatai és egyéb információk.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

POUZE PRO PROFESIONÁLNÍ POUŽITÍ,

Souprava enzymové imunoanalýzy s enzymem vázaným na imunosorbent (ELISA) ke stanovení inhibinu A obsahuje materiály pro kvantitativní měření dimerního inhibinu A v lidském séru nebo plazmě. Je určena výhradně pro použití *in vitro* jako pomoc při diagnostice a monitorování různých hormonálních poruch reprodukce. Screening Downova syndromu (trizomie 21) ve 2. trimestru při použití kombinovaných biochemických a ultrazvukových markerů může být vyhodnocen pomocí příslušných algoritmů, se kterými je možné pracovat v komerčně dostupných softwarech pro výpočet rizika.^{24,25} Důrazně se doporučuje používat ověřený (s označením CE) software určený speciálně pro vyhodnocení rizika trizomie 21, např. software alfa.* Souprava inhibinu A je určena pro použití v kombinaci s hAFP + hCG + uE3.

SHRNUTÍ

Inhibiny jsou heterodimerní proteinové hormony vylučované granulózovými buňkami vaječnicků u žen a Sertolihových buňkami varlat u mužů. Selektivně potlačují sekreci folikulostimulačního hormonu hypofýzy (FSH) a mají také lokální parakrinní účinky v pohlavních žlázách.^{1,2}

Plně zpracovaná forma molekuly inhibinu má molekulovou hmotnost přibližně 32 kD a skládá se ze dvou odlišných řetězců (α a β) propojených disulfidovými můstky. Formy s vyšší molekulovou hmotností, s prekurzorovými formami α -podjednotky, se vyskytují také ve folikulární tekutině a séru. Kromě toho jsou také přítomny formy bez α -podjednotky, které nejsou spojené s β -podjednotkami, a nemají bioaktivitu inhibinu.^{3,4,5,6}

Inhibin A se skládá z α -podjednotky a β_A -podjednotky. Měření inhibinu A se ukazuje být užitečné při studiu jeho role ve fyziologii lidské reprodukce.^{7,8,9} Několik publikovaných zpráv ukazuje užitečnost měření inhibinu A jako endokrinního markeru pro monitorování funkce vaječnicků.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Až do nedávné doby nebylo možné rozlišit cirkulující funkční dimerní inhibin a volnou α -podjednotku v normálním menstruačním cyklu u žen.

Avšak při použití vysoce charakterizovaného páru protilátek bylo zjištěno, že dvoumístný sendvičový test ELISA je schopen specificky změřit pouze dimerní inhibin A.¹⁸

PRINCIP

ELISA ke stanovení inhibinu A je enzymaticky amplifikovaný dvoukrokový „sendvičový“ test. V testu se inkubují kalibrátory, kontroly a vzorky v jamkách mikrotitračních destiček, které byly potaženy protilátkou anti-inhibinu β_A podjednotky. Po inkubaci a promytí se do každé jamky přidá detekční protilátka alfa podjednotky inhibinu A označená křenovou peroxidázou (HRP). Po druhé inkubaci a promytí se do jamek přidá substrát tetrametylbendizinu (TMB).

A nakonec se přidá stop roztok. Stupeň enzymaticky zpracovaného substrátu se stanoví na základě měření absorbance dvou vlnových délek při 450 nm a v rozmezí 600 až 630 nm. Naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci inhibinu A ve vzorcích. Sada kalibrátorů inhibinu A se používá k sestrojení kalibrační křivky absorbance proti koncentraci inhibinu A. Z této kalibrační křivky je pak možné vypočítat koncentrace inhibinu A ve vzorcích.

VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

Pro diagnostické účely *in vitro*.

Používejte zásady správné laboratorní praxe.¹⁹

Vzorky a materiály pocházející z krve mohou být rutinně zpracovávány s minimálním rizikem za použití níže popsaného postupu. S těmito materiály však zacházejte jako s potenciálně infekčními podle všeobecných bezpečnostních opatření a zásad správné klinické laboratorní praxe bez ohledu na jejich původ, úpravu nebo předchozí certifikaci.²⁰ Pro dekontaminaci používejte vhodný dezinfekční prostředek. Tyto materiály a jejich obaly skladujte a likvidujte v souladu s místními předpisy a směrnici.

KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Calibrators / Controls VAROVÁNÍ



H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
P333+P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P362+P364	Kontaminované části oděvu svlékněte a před použitím vyperte. reakční směs: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a 2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1) <0,05 %

Antibody Enzyme
Conjugate Concentrate VAROVÁNÍ





H316	Způsobuje mírné podráždění kůže.
H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
P332+P313	Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P333+P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P362+P364	Kontaminované části oděvu svlékněte a před použitím vyperte. 3-(n-morfolino)-2-hydroxypropan kyselina sulfonová, sodná sůl 1 - 2 % reakční směs: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a 2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1) <0,05 %

Sample Buffer A NEBEZPEČÍ



H316	Způsobuje mírné podráždění kůže.
H318	Způsobuje vážné poškození očí.
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.

Sample Buffer B	P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.	H318	Způsobuje vážné poškození očí.	
	P310	Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.	
	P332+P313	Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Laurylsulfát sodný 1 - < 3 % Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (aminomethan) 1 - 2 % Alkohol, sekundární C12–14, ethoxylovaný 3 - 5 %	P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.	
			P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.	
			P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.	
			P310	Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.	
			P333+P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.	
			P362+P364	Kontaminované části oděvu svlékněte a před použitím vyperte. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (aminomethan) 1 - 3 % Alkohol, sekundární C12–14, ethoxylovaný 3 - 5 % reakční směs: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a 2-methyl-4-isothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1) < 0,05 %	
Conjugate Diluent			Stop roztok		
				NEBEZPEČÍ	
					
			H314	Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.	
			P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.	
			P301+P330+P331	PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení.	
			P303+P361+P353	PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Opláchněte kůži vodou.	
			P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.	
			P310	Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. Kyselina sírová 1 - 3 %	
			Wash solution (20x)		
				NEBEZPEČÍ	
					
		H316	Způsobuje mírné podráždění kůže.		
		H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.		
				H360	Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.

P201	Před použitím si obstarejte speciální instrukce.
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
P308+P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Kyselina boritá 0,1 - 0,3 % Boritan sodný, dekahydrát 0,1 - 0,3 %



Bezpečnostní list je k dispozici na adrese
beckmancoulter.com/techdocs

SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ

Sérum a plazma jsou doporučené vzorky.

Dodržujte následující doporučení pro zacházení se vzorky krve, jejich zpracování a skladování:²¹

- Všechny vzorky krve odebírejte za dodržení obvyklých bezpečnostních opatření pro venepunkci.
- Zkumavky udržujte stále uzavřené zátkou.
- Do dvou hodin po odstředění přeneste nejméně 500 µl frakce bez buněk do skladovací zkumavky. Zkumavku okamžitě pevně uzavřete.
- Nezředěné i zředěné vzorky těsně uzavřené uložte při teplotě 2–8 °C po dobu maximálně 24 hod.
- V případě, že analýza nebude dokončena během 24 hod, nebo v případě přepravy vzorků, zmrazte při teplotě -20 °C nebo nižší po dobu až 30 dnů.

Při přípravě vzorků dbejte následujících pokynů:

- Ujistěte se, že před analýzou byly odstraněny zbytky fibrinu a buněčné částice.
- Při odstředění dbejte doporučení výrobce zkumavek.

Každá laboratoř by si měla určit přijatelnost svých vlastních zkumavek pro odběr krve a produktů na separaci séra. Tyto výrobky mohou vykazovat odchylky v závislosti na výrobci a občas i na šarži.

Vyvarujte se opakovaného zamrazování vzorků.

Zamezte analyzování lipemických, ikterických nebo hemolyzovaných vzorků.

POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Souprava ke stanovení inhibinu A: 96 jamek (Kat. č DSL-10-28100T-1)

Mikrotitrační proužky potažené protilátkou anti-inhibinu A: jeden rámeček proužků obsahující 96 jamek mikrotitračních destiček.

Polystyrénové mikrotitrační jamky s protilátkou anti-inhibin β_A fixovanou k vnitřní stěně každé jamky.

Skladujte při 2–8 °C do data expirace v uzavíratelném sáčku se sušící vložkou, abyste zabránili přístupu vlhkosti.

Koncentrát konjugátu protilátky proti inhibinu A s enzymem: jedna 0,6 ml lahvička

Konjugát myši monoklonální protilátky proti α -podjednotce inhibinu s HRP, MOPSO,BSA a <1,0 % ProClin** 300.

Skladujte při 2–8 °C do data expirace.

Před použitím rozřeďte v diluentu pro konjugát.

Kalibrátory: šest 1ml lahviček a jedna 2ml lahvička „nulového“ kalibrátoru (připravené k použití)

Koncentrace přibližně 0, 10, 30, 100, 250, 500 a 1000 pg/ml rekombinantního dimerního inhibinu A v hovězím séru s < 0,5 % ProClin 300.

Přesné koncentrace viz etikety na lahvičkách.

Skladujte uzavřené při 2–8 °C do data expirace.

Stabilní při teplotě 2 až 8 °C po dobu 28 dnů po počátečním použití. Po delší období skladujte v mrazničce při -20 °C (-15 °C až -24 °C) až do data expirace.

Měřenou veličinu (analyt) v kalibrátorech inhibinu A lze vysledovat až k prvnímu mezinárodnímu standardu Světové zdravotnické organizace pro inhibin-A (kód 91/624), který obsahuje rekombinantní lidský 32 kDa inhibin A (1 pg/ml nebo 0,037 IU/ml). Uvedené hodnoty byly stanoveny s použitím reprezentativních vzorků z této šarže standardu a jsou specifické pro metodiku kontrolních rozborů reagencí. Hodnoty získané jinými metodami se mohou lišit. Takové rozdíly – vyskytnou-li se – mohou být způsobeny odchylkami mezi metodami.

Kontroly: dvě 1,0 ml lahvičky (připravené k použití)

Nízké a vysoké koncentrace rekombinantního dimerního inhibinu A v hovězím séru s < 0,5 % ProClin 300.

Koncentrační rozmezí očekávaných hodnot jsou uvedena v příloze návodu.

Skladujte uzavřené při 2–8 °C do data expirace.

Stabilní při teplotě 2 až 8 °C po dobu 28 dnů po počátečním použití. Po delší období skladujte v mrazničce při -20 °C (-15 °C až -24 °C) až do data expirace.

Vzorkový pufr A: jedna 10,0 ml lahvička

Pufr s hovězím sérovým albuminem (BSA), zvířecím sérem (kozím, myším), povrchově aktivními látkami a azidem sodným.

Skladujte při 2–8 °C do data expirace.

Vzorkový pufr B: jedna 10,0 ml lahvička

Pufr s < 20 % peroxidu močoviny, < 0,5 % ProClin 300 a azidem sodným.

Skladujte při 2–8 °C do data expirace.

Chromogenový roztok TMB: jedna 11,0 ml lahvička

Tetrametylbendizid (TMB) v citrátovém pufru s peroxidem vodíku.

Skladujte při 2–8 °C do data expirace.

Stop roztok A: jedna 11,0 ml lahvička

0,2M kyselina sírová.

Skladujte při 2–8 °C nebo při pokojové teplotě (18-25°C) až do data expirace.

Diluent pro konjugát: jedna 15,0 ml lahvička

Pufr s BSA, zvířecím sérem (kozím, myším), povrchově aktivní látkou a < 1,0% ProClin 300.

Skladujte při 2–8 °C do data expirace.

Promyvací roztok U (20x): Jedna 50 ml lahvička

Koncentrovaný roztok musí být před použitím zředěn.

Skladujte při 2–8 °C nebo při pokojové teplotě (18-25°C) až do data expirace.

Souprava ke stanovení inhibinu A: 384 jamek (Kat. č DSL-10-28100T-4)

Mikrotitrační proužky potažené protilátkou anti-inhibinu A: Čtyři rámečky proužků, každý obsahuje 96 mikrotitračních jamek.

Koncentrát konjugátu protilátky proti Inhibinu A s enzymem: čtyři 0,6 ml lahvičky

Kalibrátory: dvanáct 1 ml lahviček a dvě 2 ml lahvičky „nulového“ kalibrátoru (připravené k použití)

Kontroly: čtyři 1,0 ml lahvičky (připravené k použití)

Pufr pro ředění vzorků A: čtyři 10,0 ml lahvičky

Pufr pro ředění vzorků B: tři 10,0 ml lahvičky

Chromogenový roztok TMB: jedna 50,0 ml lahvička

Stop roztok A: čtyři 11,0 ml lahvičky

Diluent pro konjugát: čtyři 15,0 ml lahvičky

Promyvací roztok (20x): 2 lahvičky (po 50 ml)

VYŽADOVANÉ, ALE NEPOSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- Čtečka mikrotitračních destiček schopná měření absorbance při 450 nm a přednostně schopná dvojí korekce vlnové délky v rozmezí 600 až 630 nm
- Deionizovaná voda

- Přesná mikropipeta na 50–100 µl
- Třepačka na mikrotitrační destičky schopná dosáhnout 500-700 orbitálních otáček za minutu (ot/min)
- Automatická promývačka destiček
- Vibrační míchadlo
- Savý materiál pro osušení proužků jamek
- Grafický papír pro analýzu dat

POSTUP

Poznámky k postupu

- Důkladné pochopení této příbalové informace je nezbytné pro úspěšné použití soupravy ELISA ke stanovení inhibinu A.
- Uživatel je zodpovědný za posouzení vhodnosti soupravy pro zamýšlené použití.
- Spolehlivé výsledky lze získat pouze při uplatnění správných laboratorních postupů a při přesném dodržování návodu.
- Pro každou novou sérii analýz je nutné provést novou kalibraci.
- Reagencie před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu (18-25°C).
- Pečlivě promíchejte reagencie před použitím jemným obracením.
- Nemíchejte různé šarže žádné ze složek soupravy v rámci jednoho stanovení.
- Nepoužívejte žádnou složku po uplynutí doby expirace uvedené na jejím štítku.
- Nedostatečné promytí jamek může mít za následek špatnou reprodukovatelnost a nesprávné výsledky.
- Aby se zabránilo driftu způsobnému různě dlouhou inkubací substrátu, je třeba pipetovat stop roztok do jamek ve stejném pořadí a se stejnou rychlostí jako byl pipetován roztok chromogenu TMB.
- Se všemi reagencemi manipulujte opatrně, aby se zabránilo zavedení mikrobiálních kontaminantů, které mohou reagencie poškodit, zejména diluent pro konjugát a vzorkový pufr A.
- Zabraňte kontaminaci roztoku TMB roztoky konjugátů.
- Pro každou reagencii, kalibrátor, kontrolu či vzorek použijte novou výměnnou špičku pipety.
- Pro dávkování kyseliny sírové a roztoku chromogenu TMB použijte pipety bez kovových částí.
- Enzym použitý v soupravě se inaktivuje kyslíkem a je velmi citlivý na mikrobiální kontaminaci, azid sodný, kyselinu chlornou a aromatické chlorované uhlovodíky, které se často vyskytují v laboratorních rozvedcích vody.
- Používejte deionizovanou vodu.
- Nevystavujte reagencie při skladování a při inkubaci nadměrnému teplu a přímému slunečnímu světlu.

Příprava a skladování reagensů

1. **Promývací roztok:** Nalijte obsah lahvičky do 950 ml destilované vody a homogenizujte. Zředěný roztok lze skladovat při teplotě 18–25 °C po dobu jednoho měsíce nebo při teplotě 2–8 °C až do data expirace soupravy.
2. **Roztok konjugátu protilátky s enzymem:** Koncentrát konjugátu protilátky s enzymem by se měl rozředit v poměru 1 díl do 50 dílů diluentu pro konjugát inhibinu A podle počtu použitých jamek. Pro celou destičku napipetujte 220 µl koncentráту konjugátu protilátky s enzymem do 11 ml diluentu pro konjugát.
POZNÁMKA: Koncentrát konjugátu protilátky s enzymem by měl být před použitím čerstvě ředěný po dobu 10-15 min.
3. **Mikrotitrační jamky:** Vezměte počet jamek, které budete potřebovat pro analýzu. Zbylé jamky znovu zasuňte do sáčku s vysoušedlem a pečlivě uzavřete. Sáček musí být pečlivě uzavřen, zabraňte přístupu vlhkosti.

Schéma postupu

Nechte všechny vzorky a reagencie temperovat na pokojovou teplotu (18-25°C). Před použitím reagensů pečlivě promíchejte jemným obracením. Po rekonstituci reagensů důkladně promíchejte, zamezte přítom tvorbě pěny. Kalibrátory, kontroly a vzorky by měly být analyzovány v duplikátech.

1. Označte jamky pro analýzu.
2. Do příslušných jamek napipetujte 50 µl kalibrátorů, kontrol a vzorků.
3. Přesnou pipetou přidejte do každé jamky 50 µl pufru pro ředění vzorků A.
4. Přesnou pipetou přidejte do každé jamky 50 µl pufru pro ředění vzorků B.
5. Jamky se inkubují za třepání při 500–700 ot/min na orbitální třepačce mikrotitračních destiček po dobu tří hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
6. Roztok konjugátu protilátky s enzymem se připraví zředěním koncentrovaného konjugátu protilátky s enzymem v diluentu pro konjugát inhibinu A, jak je popsáno v části „Příprava reagensů“ tohoto příbalového letáku.
7. Odsajte a promyjte každou jamku šestkrát promývacím roztokem pomocí automatické promývačky mikrotitračních destiček nebo ručně pomocí přesné pipety. Odsajte a vysušte převrácením destičky na absorpční materiál.

POZNÁMKA: Důrazně se doporučuje použít automatickou promývačku mikrotitračních destiček. Neúplné vymytí bude mít nepříznivý vliv na přesnost rozboru. Není-li promývačka k dispozici, postupujte podle následujících kroků pro ruční mytí destiček:

(a) Z každé jamky zcela odsajte tekutinu

(b) Do každé jamky napipetujte 350 µl promývacího roztoku pomocí přesné pipety

(c) Znovu odsajte tekutinu

(d) Pětkrát opakujte kroky (b) a (c)

8. Přesnou pipetou přidejte do každé jamky 100 µl roztoku konjugátu protilátky označené enzymem.
9. Jamky se inkubují za třepání při 500-700 ot/min na orbitální třepačce mikrotitračních destiček po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě (18-25°C).
10. Odsajte a promyjte každou jamku šestkrát promývacím roztokem pomocí automatické promývačky mikrotitračních destiček. Odsajte do sucha převrácením destičky na absorpční materiál.
11. Přesnou pipetou přidejte do každé jamky 100 µl chromogenového roztoku TMB.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

12. Jamky se inkubují za třepání při 500–700 ot/min na orbitální třepačce mikrotitračních destiček po dobu 15 minut při pokojové teplotě (18-25°C).

POZNÁMKA: Zbarvení se může vyvinout rychleji nebo pomaleji, než je doporučená doba inkubace, a to v závislosti na okolní teplotě. Vizualně sledujte vývoj zbarvení, aby bylo možné optimalizovat dobu inkubace.

13. Přesnou pipetou přidejte do každé jamky 100 µl stop roztoku.
14. Odečtěte absorbanci roztoku v jamkách do 30 minut na čtečce mikrotitračních destiček nastavené na 450 nm.

POZNÁMKA:

1) Při odečtu absorbance mikrotitrační jamky je třeba naprogramovat nulový kalibrátor jako „Blank“.

2) Pokud je k dispozici korekce vlnové délky, nastavte přístroj na měření dvou vlnových délek – jednu při 450 nm a druhou vlnovou délku pro korekci pozadí v rozmezí 600 až 630 nm.

VÝSLEDKY

1. Vypočítejte průměrnou absorbanci pro každý kalibrátor, kontrolu nebo vzorek.
2. Vyneste logaritmus průměrné absorbance pro každý z kalibrátorů na ose y proti logaritmu koncentrace inhibinu A v pg/ml na ose x s použitím lineárního proložení. Alternativně lze použít zanesení dat lineární vs. lineární a rovnoměrné propojení aproximační křivkou.
3. Průměrem duplikátů proložte co nejlépe odpovídající křivkou.
4. Stanovte koncentrace inhibinu A kontrol a vzorků ze standardní křivky spárováním jejich středních hodnot odečtů absorbance s odpovídajícími koncentracemi inhibinu A.
5. Každý odečet vzorku vyšší, než je nejvyšší kalibrátor, by měl být vhodně rozředěn pomocí kalibrátoru 0 inhibinu A a znovu analyzován.

6. Výsledky všech vzorků s odečtenou hodnotou nižší než hodnota nejnižšího kalibrátoru by měly být ve výsledcích uvedeny jako „< koncentrace kalibrátoru 1“.
7. Vynásobte nalezenou hodnotu faktorem ředění, je-li třeba.

POZNÁMKA: V případě, že odečty absorbance překročí mez na čtečce destiček, je zapotřebí druhý odečet při 405 nm (referenční filtr v rozmezí 600 až 630 nm, pokud je k dispozici). V tomto případě přejděte ke konstrukci druhé kalibrační křivky, jak je uvedeno výše, s odečty absorbance všech kalibrátorů při 405 nm. Koncentrace vzorků mimo stupnici měření při 450 nm se pak odečte z nové kalibrační křivky. Odečty při 405 nm by neměly nahrazovat odečty naměřené na stupnici při 450 nm.

Kalibrační křivka

Kalibrátory	Konc. (pg/ml)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Blank)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

Vzorky

Pro převod IU/ml použijte následující rovnici:

$$1 \text{ IU/ml (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/ml}$$

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní referenční rozsahy, zajišťující náležité zastoupení specifických populací. Následující uvedené hodnoty byly získány pomocí soupravy ELISA ke stanovení inhibinu A při použití vzorků séra od zjevně normálních zdravých dospělých osob. Všechny hodnoty jsou uvedeny v pg/ml. Pro ženy s normálním menstruačním cyklem představují čísla pod každou fází dny před nebo po náhlém vzestupu LH.

Populace	n	Střed. hodn.	Medián	95 % rozsah spolehlivosti
Ženy s normálním cyklem				
Časná folikulární fáze (-14 až -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Střední folikulární fáze (-9 až -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Pozdní folikulární fáze (-3 až -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Uprostřed cyklu (den 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Raná luteální fáze (1 až 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Střední luteální fáze (4 až 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Pozdní luteální fáze (12 až 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Vrcholové hladiny IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1 690
PCOS - Ovulační stav	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Po menopauze	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Normální muži	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Hodnoty inhibinu A pod hodnotou kalibrátoru 1 jsou extrapolovány.

Hodnoty uvedené v následující tabulce jsou inhibin A v mateřském séru ve druhém trimestru.

Ukončený týden	Počet vzorků	Medián inhibinu A (pg/ml)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabulka upravená podle hodnot poskytnutých americkým screeningovým centrem (2005).

KONTROLA KVALITY

- Kontroly ELISA inhibinu A nebo jiné komerční kontroly by se měly pohybovat ve stanovených mezích spolehlivosti.

- Koncentrační rozmení pro kontrolní vzorky ELISA inhibinu A jsou vytištěny na dodatku návodu.
- Každý rozbor by měl zahrnovat kalibrační křivku, plus kontroly nízkých a vysokých hladin.
- Roztok chromogenu TMB by měl být bezbarvý až velmi lehce žlutý. Modré zbarvení roztoku TMB signalizuje kontaminaci nebo nestabilitu reagencie.
- Materiály pro kontrolu jakosti simulují vlastnosti klinických vzorků a jsou nezbytné ke sledování výkonnosti systému imunochemických analýz. Použijte materiál pro kontrolu jakosti QC nebo jiné komerčně dostupné materiály pro kontrolu jakosti, jež pokrývají nejméně dvě hladiny analytu. Častější provádění kontrol nebo přidání dalších kontrol je ponecháno na uvážení uživatele na základě správné laboratorní praxe nebo požadavků na akreditaci laboratoře a příslušných zákonů. Respektujte pokyny výrobce ohledně rekonstituce a uskladnění. Každé laboratorní pracoviště musí v zájmu zajištění optimálního výkonu určit své vlastní střední hodnoty a přípustné rozsahy. Výsledky kontroly jakosti vybočující z přijatelných mezí mohou být příznakem neplatných výsledků testů.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

(Podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

Vzorová data slouží pouze k ilustrativním účelům. Výsledky získané v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

Citlivost

Mez měřitelnosti (LoD): 2,61 pg/ml

Specifita

Protilátka použitá v imunoanalytickém testu je vysoce specifická pro inhibin A.

Přesnost

Intra-assay

Vzorky byly analyzovány 25x v jednom stanovení. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 4,6 % pro vzorky séra.

Inter-assay

Vzorky byly analyzovány duplikátech v 10 nezávislých analýzách. Hodnoty variačního koeficientů byly menší nebo rovny 6,9 % pro vzorky séra.

Správnost

Test ředění

Vzorky s vysokou koncentrací byly postupně ředěny nulovým kalibrátorem. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 97,8 % až 117 %.

Test „recovery“

Vzorky s nízkou koncentrací byly obohaceny známými množstvími inhibinu A. Dosažené hodnoty se pohybovaly v procentuálním rozmezí 83,5 % až 99,5 %.

Rozsah měření (od meze měřitelnosti až po nejvyšší kalibrátor): 2,61 do přibližně 1 000 pg/ml.

OMEZENÍ

- Reagencie dodané v této soupravě jsou optimalizovány pro měření hladin inhibinu A v séru nebo plazmě.
- U stanovení využívajících protilátky existuje možnost interference heterofilními protilátkami ve vzorku. Vzorky osob, které byly pravidelně ve styku se zvířaty nebo podstoupily imunoterapii či diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protilátky, jako například HAMA, které interferují při imunologických rozbořech. Ve vzorcích mohou být přítomny také další heterofilní protilátky, například lidské protilátky proti kozím proteinům.^{22,23} Takové interferující protilátky mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost takovýchto protilátek, posuzujte s opatrností.
- Pokud reagencie jeví známky mikrobiální kontaminace nebo je silně zakalená, lahvičku vylijte.
- Výsledky stanovení inhibinu A ELISA testu by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta, včetně příznaků, anamnézy, údajů z dalších testů a dalších příslušných informací.

INHİBİN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

SADECE PROFESYONEL KULLANIM İÇİN,

İnhibin A enzime bağlı bağışıklık deneyi (ELISA) kiti, insan serumu veya plazmasında dimerik inhibin A'nın kantitatif ölçümü için malzemeler sağlar. Çeşitli hormonal üreme bozukluklarının tanısı ve izlenmesinde yardımcı olarak kesinlikle *in vitro* kullanım amacıyla tasarlanmıştır. 2. trimesterde birleşik biyokimyasal ve ultrason markörleri kullanılan Down sendromu (Trizomi 21) taraması, piyasada bulunan risk hesaplama yazılımında çalıştırılacak uygun algoritmalarla değerlendirilebilir.^{24, 25} Özellikle Trizomi 21 riskini değerlendirmek üzere tasarlanmış onaylı (CE işaretli) bir yazılım, örn. yazılım alfa kullanılması önerilmektedir.* İnhibin A kiti hAFP + hCG + uE3 ile kombinasyon halinde kullanılmalıdır.

ÖZET

İnhibinler kadınlarda yumurtalığın granüloza hücreleri ve erkeklerde testislerin Sertoli hücreleri tarafından salgılanan heterodimerik protein hormonlarıdır. Hipofiz bezindeki folikül uyarıcı hormon (FSH) salgılanmasını seçici biçimde baskırlar ve ayrıca gonadlarda lokal parakrin işlemleri sergilerler.^{1,2}

İnhibin molekülünün tam işlenmiş formunun moleküler ağırlığı yaklaşık 32 kD'dir ve bu form disülfid köprüleri ile bağlanan iki ayrı zincirden (α ve β) oluşur. Folliküler sıvı ve serumda α -alt biriminin prekürsör biçimlerine sahip daha yüksek moleküler ağırlıklı biçimler de oluşur. Ayrıca, β -alt birimiyle ilişkili olmayan ve inhibin biyoaktivitesinden mahrum serbest α -alt birim formları da mevcuttur.^{3,4,5,6}

İnhibin A bir α -alt birimi ve bir β_A -alt birimi içerir. İnhibin A ölçümleri, insan üreme fizyolojisindeki rolünün incelenmesinde faydalıdır.^{7,8,9} Çeşitli yayınlanmış raporlar, inhibin A ölçümünün over fonksiyonunu izlemede endokrin markörü olarak kullanıldığını göstermektedir.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Yakın zamana kadar, insanlardaki normal menstrüasyon döngüsünde dolaşımdaki fonksiyonel dimerik inhibin ile serbest α -alt birimi arasında ayırım yapmak mümkün değildi.

Ancak, yüksek seviyede karakterize antikor çifti kullanılarak, iki taraflı sandviç ELISA'nın özellikle sadece dimerik inhibin A'yı ölçebildiği bulunmuştur.¹⁸

PRENSİP

İnhibin A ELISA, enzimatik olarak güçlendirilmiş iki adımlı "sandviç" bir testtir. Testte kalibratörler, kontroller ve örnekler anti-inhibin β_A alt birimi antikoruyla kaplanmış mikrotitrasyon kuyucuklarında inkübe edilir. İnkübasyon ve yıkamanın ardından, her kuyucuğa yabanturpu peroksidaz (HRP) etiketli anti-inhibin alfa alt birimi saptama antikorunu eklenir. İkinci inkübasyon ve yıkama adımının ardından, kuyucuklara substrat tetrametilbenzidin (TMB) eklenir.

Son olarak, asidik durdurma çözeltisi eklenir. Substratın enzimatik devir derecesi 450 nm'de ve 600 ile 630 nm arasında ikili dalga boyu absorbansı ölçümüyle belirlenir. Ölçülen absorbans, örneklerdeki inhibin A konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. İnhibin A konsantrasyonuna karşı standart absorbans eğrisi çizmek üzere bir İnhibin A kalibratörler seti kullanılır. Örneklerdeki inhibin A konsantrasyonları bu standart eğriden hesaplanabilir.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

***In vitro* diagnostik kullanım içindir.**

İyi laboratuvar uygulamalarını kullanın.¹⁹

Örnekler ve kan ürünleri, açıklanan prosedür kullanılarak minimum risk ile düzenli olarak işlenebilir. Ancak, bu ürünleri, kaynağına, işlenmesine veya ön sertifikalarına bakılmaksızın evrensel koruma önlemlerine ve iyi klinik laboratuvar uygulamalarına uygun olarak, bulaşıcı potansiyele sahip maddeler gibi kullanın.²⁰ Dekontaminasyon için uygun bir dezenfektan kullanın. Bu maddeleri ve kaplarını yerel yönetmeliklere ve kılavuzlara uygun olarak saklayın ve atın.

GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Calibrators / Controls

UYARI



H317	Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
H412	Sucul ortamda uzun süre kalıcı, zararlı etki.
P273	Çevreye verilmesinden kaçının.
P280	Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P333+P313	Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın. reaksiyon kütleleri: 5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-one [EC# 247-500-7] ve 2-metil-4-izotiazolin-3-one [EC# 220-239-6] (3:1) <%0,05

Antibody Enzyme
Conjugate Concentrate

UYARI



H316	Hafif cilt tahrişine yol açar.
H317	Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
H412	Sucul ortamda uzun süre kalıcı, zararlı etki.
P273	Çevreye verilmesinden kaçının.
P280	Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P332+P313	Ciltte tahriş söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P333+P313	Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın. 3-(N-Morfolino)-2-hidroksi Propan Sülfonik Asit, Sodyum Tuzu 1 - %2 reaksiyon kütleleri: 5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-one [EC# 247-500-7] ve 2-metil-4-izotiazolin-3-one [EC# 220-239-6] (3:1) <%0,05

Sample Buffer A

TEHLİKE



H316	Hafif cilt tahrişine yol açar.
H318	Ciddi göz hasarına yol açar.
P280	Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P305+P351+P338	GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin.
P310	Hemen ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru/hekimi arayın.
P332+P313	Ciltte tahriş söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.

Kan örneklerinin kullanımı, işlenmesi ve saklanması ile ilgili olarak aşağıdaki tavsiyelere uyun:²¹

- Tüm kan örneklerini hastadan kan alınması ile ilgili rutin önlemlere dikkat ederek toplayın.
- Tüpleri daima tapalı halde tutun.
- Santrifüj sonrasında iki saat içinde saklama tüpüne en az 500 µL hücresiz örnek aktarın. Tüpü hemen stoperle sıkıca kapatın.
- Seyreltilmemiş veya seyreltilmiş örnekleri en fazla 24 saat süreyle 2-8°C'de sıkıca kapatılmış olarak saklayın.
- Test 24 saat içinde tamamlanmayacaksa veya örnekler sevk edilecekse, 30 güne kadar -20°C veya daha düşük sıcaklıkta dondurun.

Örnekleri hazırlarken aşağıdaki kılavuz ilkeleri kullanın:

- Analizden önce fibrin kalıntılarının ve hücresel maddelerin giderildiğinden emin olun.
- Santrifüjleme işlemi için kan toplama tüpü üreticisinin talimatlarını izleyin.

Her laboratuvar kendi kan toplama tüplerinin ve serum ayırıştırma ürünlerinin kabul edilebilirliğini belirlemelidir. Bu ürünler değişik üreticiler ve zaman zaman da lotlar arasında farklılık gösterebilir.

Örneklerin tekrarlı biçimde dondurulmasından ve çözülmesinden kaçının.

Lipemik, ikterik veya hemolize örnekleri test etmekten kaçının.

SAĞLANAN MALZEMELER

İnhibin A saptaması için kitler: 96 kuyucuk (Kat. #DSL-10-28100T-1)

Anti-İnhibin A Antikor Kaplı Mikrotitrasyon stripleri: 96 mikrotitrasyon kuyucuğu içeren bir strip tutucu.

Her kuyucuğun iç duvarına sabitlenmiş anti-İnhibin β_A içeren polistiren mikrotitrasyon kuyucukları.

Tekrar kapatılabilir poşette nemden korumak üzere bir kurutucu ile son kullanma tarihine kadar 2-8°C sıcaklıkta saklayın.

İnhibin A Antikor-Enzim Konjugat Konsantresi: bir adet 0,6 mL flakon

Fare monoklonal anti-İnhibin α-alt birimi antikor-HRP konjugatı, MOPSO, BSA ve < %1,0 ProClin** 300.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklayın.

Kullanmadan önce Konjugat Dilüent içinde seyreltin.

Kalibratörler: Altı adet 1 mL flakon ve bir adet "sıfır" kalibratörlü 2 mL flakon (kullanıma hazır)

< %0,5 ProClin 300 içeren siğir serumunda yaklaşık 0, 10, 30, 100, 250, 500 ve 1.000 pg/mL rekombinant dimerik İnhibin A konsantrasyonları.

Kesin konsantrasyonlar için flakon etiketlerine bakın.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C sıcaklıkta açılmamış olarak saklayın.

İlk kullanımdan sonra 2 ila 8°C'de 28 gün süreyle stabildir. Daha uzun süreler için son kullanma tarihine kadar -20°C dondurucuda (-15°C ila -24°C) saklayın.

İnhibin A kalibratörler ölçülen büyüklük (analit), rekombinant 32 kDa insan İnhibin A (1 pg/mL veya 0,037 IU/mL) içeren İnhibin-A (kod 91/624) için Dünya Sağlık Örgütü Birinci Uluslararası Standardı ile izlenebilir. Belirlenmiş değerler, bu standard lotundan alınan temsili örnekler kullanılarak tespit edilmiştir ve reaktiflerinin test metodolojilerine özgüdür. Diğer metodolojiler tarafından belirlenen değerler farklı olabilir. Varsa, bu tür farklılıkların nedeni yöntemler arası sapma olabilir.

Kontroller: iki adet 1,0 mL flakon (kullanıma hazır)

< %0,5 ProClin 300 içeren siğir serumunda düşük ve yüksek rekombinant dimerik İnhibin A konsantrasyonları.

Beklenen konsantrasyon aralığı kit içinde ayrıca not olarak eklenmiştir.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C sıcaklıkta açılmamış olarak saklayın.

İlk kullanımdan sonra 2 ila 8°C'de 28 gün süreyle stabildir. Daha uzun süreler için son kullanma tarihine kadar -20°C dondurucuda (-15°C ila -24°C) saklayın.

Örnek Tamponu A: Bir adet 10,0 mL şişe

Siğir serum albümini (BSA), hayvan serumu (keçi, fare), sürfaktan ve sodyum azid içeren tampon.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklayın.

Örnek Tamponu B: Bir adet 10,0 mL şişe

< %20 üre hidrojen peroksit, < %0,5 ProClin 300 ve sodyum azid içeren tampon.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklayın.

TMB Kromojen Çözeltisi: Bir adet 11,0 mL'lik şişe

Hidrojen peroksit içeren sitrat tamponunda tetrametilbenzidin (TMB).

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklayın.

Durdurma Çözeltisi A: Bir adet 11,0 mL şişe

0,2 M sülfürik asit.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de veya oda sıcaklığında (18-25°C) saklayın.

Konjugat Dilüent: Bir adet 15,0 mL'lik şişe

BSA, hayvan serumu (keçi, fare), sürfaktan ve < %1,0 ProClin 300 içeren tampon.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklayın.

Yıkama çözeltisi U (20x): Bir adet 50 mL'lik flakon

Konsantre solüsyon kullanmadan önce dilüe edilmelidir.

Son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de veya oda sıcaklığında (18-25°C) saklayın.

İnhibin A saptaması için kitler: 384 kuyucuk (Kat. #DSL-10-28100T-4)

Anti-İnhibin A Antikor Kaplı Mikrotitrasyon stripleri: Her biri 96 mikrotitrasyon kuyucuğu içeren dört strip tutucu.

İnhibin A Antikor-Enzim Konjugat Konsantresi: dört adet 0,6 mL flakon

Kalibratörler: on iki adet 1 mL flakon ve iki adet "sıfır" kalibratörlü 2 mL flakon (kullanıma hazır)

Kontrol serumları: dört adet 1,0 mL flakon (kullanıma hazır)

Örnek Tamponu A: Dört adet 10,0 mL şişe

Örnek Tamponu B: Üç adet 10,0 mL şişe

TMB Kromojen Çözeltisi: Bir adet 50,0 mL'lik şişe

Durdurma Çözeltisi A: Dört adet 11,0 mL şişe

Konjugat Dilüent: Dört adet 15,0 mL'lik şişe

Yıkama çözeltisi (20x): iki 50 mL flakon

GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEMELER

Standard laboratuvar ekipmanlarına ek olarak aşağıdaki malzemeler gerekmektedir:

- 450 nm'de absorpsiyon ölçümü yapabilen ve tercihen 600 ile 630 nm arasında ikili dalga boyu düzeltmesi yapabilen mikrotitrasyon plaka okuyucu
- Deiyonize Su
- 50-100 µL iletme için hassas pipet
- Dakikada 500-700 orbital devir (rpm) yapabilen mikrotitrasyon plaka çalkalayıcı
- Mikrotitrasyon plaka yıkayıcı
- Vorteks karıştırıcı
- Stripleri emdirmek için emici materyal
- Manuel veri azaltma için grafik kağıdı

PROSEDÜR

İŞLEMLE İLGİLİ NOTLAR

- İnhibin A ELISA'nın başarılı biçimde kullanılması için bu prospektüs iyice anlaşılmalıdır.
- Testi kendi kullanımı için doğrulamak müşterinin sorumluluğundadır.
- Güvenilir sonuçlar ancak hassas laboratuvar tekniklerinin kullanılması ve prospektüse doğru şekilde uyulmasıyla elde edilir.
- Her deney için bir standard eğrisi dahil edilmelidir.
- Kullanımdan önce tüm kit reaktiflerini oda sıcaklığına (18-25°C) getirin.
- Reaktifleri kullanımdan önce hafif ters çevirmeye iyice karıştırın.

- Herhangi bir kit bileşeninin çeşitli lotlarını tek bir test için karıştırmayın.
- Hiçbir bileşeni etiketinde gösterilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Tam olmayan yıkama sonucu ve testin doğruluğunu olumsuz etkiler.
- Substrat inkübasyon süresindeki değişiklikler nedeniyle olası test sapmalarını en aza indirmek üzere kuyulara durdurucu solüsyonu, TMB kromojen solüsyonunu eklemek için kullanılan sıra ve hız kullanılarak eklemeye dikkat edilmelidir.
- Reaktiflere zarar verebilecek mikrobik kontaminasyonlardan kaçınmak için tüm reaktifleri, özellikle Konjugat Dilüent ve Örnek Tampon A'yı dikkatle kullanın.
- TMB kromojen solüsyonunun konjugatlarla kontaminasyonundan kaçının.
- Her reaktif, kalibratör, kontrol veya örnek için temiz bir tek kullanımlık pipet ucu kullanın.
- Sülfürik asit ve TMB kromojen solüsyonu vermek için metal kısımları olan pipetlerden kaçının.
- Etiket olarak kullanılan enzim oksijenle inaktive olur ve mikrobik kontaminasyon, sodyum azit, hipokloröz asit ve laboratuvar su kaynaklarında sıklıkla bulunan aromatik hidrokarbonlara yüksek ölçüde hassastır.
- Deiyonize su kullanın.
- Reaktiflerin saklama ve inkübasyon sırasında aşırı sıcaklık veya doğrudan güneş ışığına maruz kalmasından kaçının.

Reaktiflerin hazırlanması

1. **Yıkama Çözeltisi:** Flakonun içeriğini 950 mL distile suya dökün ve homojenleştirin. Seyreltilen çözelti, bir ay 18-25°C'de veya kitin son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklanabilir.
2. **Inhibin A Antikor-Enzim Konjugat Çözeltisi:** Inhibin A Antikor-Enzim Konjugat Konsantresi, kullanılan kuyu sayısına göre 1 kısma 50 kısım Inhibin A konjugat seyreltici oranında seyreltilmelidir. Tüm plaka için tam olarak 220 µL Inhibin A antikor-enzim konjugat Konsantresini 11 mL konjugat seyreltici pipetleyin.
NOT: Inhibin A antikor-enzim konjugatı Konsantresi, kullanımdan 10-15 dakika önce taze olarak seyreltilmelidir.
3. **Mikrotitrasyon Kuyuları:** Test için gerekli kaplı kuyu sayısını seçin. Kalan kullanılmamış kuyular tekrar mühürlenemez poşete bir kurutucuyla yerleştirilmelidir. Poşet nemden korumak üzere tekrar mühürlenmelidir.

Test prosedürü

Tüm örneklerin ve reaktiflerin oda sıcaklığına (18-25°C) gelmesini bekleyin. Reaktifleri kullanmadan önce yavaşça ters yüz ederek iyice karıştırın. Reaktifleri sulandırdıktan sonra, köpük oluşumunu önleyerek iyice karıştırın. Kalibratörler, kontroller ve örnekler iki kez test edilmelidir.

1. Kullanılacak mikrotitrasyon striplerini işaretleyin.
2. Uygun kuyulara kalibratörler çözelti, kontroller ve örneklerden 50 µL pipetleyin.
3. Hassas pipetler kullanarak her kuyucuğa 50 µL Örnek Tamponu A ekleyin.
4. Hassas pipetler kullanarak her kuyucuğa 50 µL Örnek Tamponu B ekleyin.
5. Kuyuları, oda sıcaklığında (18-25°C), orbital mikropilaka karıştırıcıda ve 500-700 rpm'de üç saat karıştırarak inkübe edin.
6. Antikor-enzim konjugat Konsantresini, bu paket ekinin "Reaktiflerin Hazırlanması" kısmında açıklandığı şekilde, Inhibin A konjugat seyreltici içinde seyrelterek antikor-enzim konjugat çözeltisini hazırlayın.
7. Her bir kuyuyu, otomatik mikropilaka yıkayıcı ile veya hassas bir pipet kullanarak elle altı kez aspire edip yıkayın. Plakayı emici madde üzerine ters çevirerek kurutun.

NOT: Otomatik mikropilaka yıkayıcı kullanılması kesinlikle önerilir. Tamamlanmamış yıkama testin hassasiyetini olumsuz etkiler. Bir mikropilaka yıkayıcı yoksa, plakayı elle yıkamak için şu adımları izleyin:

(a) Her bir kuyudaki sıvıyı tamamen aspire edin

(b) Hassas pipet kullanarak her bir kuyuya 350 µL yıkama çözeltisi dağıtın

(c) Sıvıyı tekrar aspire edin

(d) (b) ile (c) arasındaki adımları beş kez tekrar edin

8. Hassas pipet kullanarak, her bir kuyuya 100 µL antikor-enzim konjugatı ekleyin.
9. Kuyuları, oda sıcaklığında (18-25°C), orbital mikropilaka karıştırıcıda ve 500-700 rpm'de bir saat karıştırarak inkübe edin.
10. Her bir kuyuyu, otomatik mikropilaka yıkayıcı kullanarak, yıkama çözeltisiyle altı kez aspire edin. Plakayı emici madde üzerine ters çevirerek kurutun.
11. Hassas pipet kullanarak, her bir kuyuya 100 µL TMB kromojen çözeltisi ekleyin.

Doğrudan güneş ışığına maruz bırakmayın.

12. Kuyuları, oda sıcaklığında (18-25°C), orbital mikropilaka karıştırıcıda ve 500-700 rpm'de 15 dakika karıştırarak inkübe edin.

NOT: Mevcut oda sıcaklığına bağlı olarak, rengin önerilen inkübasyon süresinden daha hızlı veya daha yavaş oluşabileceğini unutmayın. Inkübasyon süresini optimize etmek için renk oluşumunu görsel olarak izleyin.

13. Hassas pipet kullanarak, her bir kuyuya 100 µL durdurma çözeltisi ekleyin.
14. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak kuyucuklardaki çözeltinin absorbans değerini 30 dakika içinde okuyun.

NOT:

1) Mikrotitrasyon kuyusunun absorbansını okurken, sıfır Kalibratör "Boş" olarak programlamak gerekmektedir.

2) Dalga boyu düzeltilmesi mevcutsa, dalga boyu düzeltilmesi 600 ila 630 nm'ye ayarlanmış olarak, cihazı 450 nm'de ikili dalga boyu ölçümüne ayarlayın.

SONUÇLAR

1. Her kalibratör, kontrol veya örnek için ortalama absorbans hesaplayın.
2. Y eksenini üzerinde kalibratörleri her birinin ortalama absorbans okumalarının logunu x eksenini üzerinde pg/mL cinsinden inhibin A konsantrasyonlarının loguna karşı, doğrusal eğri uydurma kullanarak çizin. Alternatif olarak, veriler doğrusal/doğrusal olarak çizilebilir ve düz spline eğri uydurma kullanılabilir.
3. Çift noktaların ortalamasından en uygun eğriyi seçin.
4. Kontrollerin ve örneklerin Inhibin A konsantrasyonlarını, ortalama absorbans okumalarını ilgili Inhibin A konsantrasyonlarıyla eşleştirerek standart eğriden tespit edin.
5. En yüksek kalibratörden yüksek olan örnek okumaları Inhibin A Kalibratör 0 kullanılarak uygun biçimde seyreltilmeli ve tekrar test edilmelidir.
6. Analitik hassasiyetten daha düşük ölçülen herhangi bir örnek bu şekilde rapor edilmelidir.
7. Gerekirse değeri bir seyreltme faktörüyle çarpın.

NOT: Absorbans okumaları plaka okuyucunun sınırlarını aşarsa, 405 nm'de ikinci bir okuma gerekir (varsa 600 ile 630 nm arasında referans filtre). Bu durumda, 405 nm'deki tüm standartların absorbans okumalarıyla yukarıdaki gibi ikinci bir standart eğri oluşturmaya geçin. 450 nm'deki ölçeksiz örneklerin konsantrasyonu bu durumda yeni standart eğriden okunur. 405 nm'deki okumalar 450 nm'deki ölçekli okumaların yerini almamalıdır.

Standard eğrisi

Kalibratörler	Kons. (pg/mL)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Kör)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Standard eğrisi örneği, hesaplamada kullanmayınız).

Nümuneler

IU/mL'den dönüştürme için aşağıdaki denklemi kullanın:

$$1 \text{ IU/mL (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$$

BEKLENEN DEĞERLER

Spesifik popülasyonların uygun şekilde temsil edilmesini sağlamak için her laboratuvar kendi referans aralıklarını oluşturmalıdır. Normal görünen sağlıklı yetişkinlerin serum örnekleri kullanılarak İnhibin A ELISA ile aşağıda verilmiş olan değerler elde edilmiştir. Tüm değerler pg/mL cinsinden bildirilmektedir. Normal adet döngüsüne sahip kadınlarda, her fazın altındaki rakamlar LH dalgası öncesi veya sonrasındaki günleri temsil eder.

Popülasyon	n	Ortalama	Medyan	%95 Güven aralığı
Normal Adet Döngüsüne Sahip Kadınlar				
Erken Folliküler Evre (-14 ila -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Orta Folliküler (-9 ila -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Geç Folliküler (-3 ila -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Orta Döngü (Gün 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Erken Luteal (1 ila 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Orta Luteal (4 ila 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Geç Luteal (12 ila 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
IVF Pik seviyeleri	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1.690
PCOS - Yumurtlama	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Postmenopozal	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Normal Erkekler	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Kalibratör 1 altındaki inhibin A değerleri ekstrapolasyon sonucudur.

Aşağıdaki tabloda temsil edilen değerler ikinci trimesterdeki maternal serum inhibin A'dır.

Tamamlanan hafta	Numune adedi	Medyan İnhibin A (pg/mL)	LOG ₁₀ SS
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

ABD'deki bir tarama merkezinden elde edilen değerlerden uyarlanan tablo (2005).

KALİTE KONTROL

- İnhibin A ELISA kontrolleri veya diğer ticari kontroller, belirlenen güven limitleri dahilinde olmalıdır.
- İnhibin A ELISA kontrollerinin güven limitleri ek üzerinde basılır.
- Her teste tam bir standart eğri ve ayrıca düşük ve yüksek seviyede kontroller dahil edilmelidir.
- TMB kromojen solüsyonu renksiz ile çok açık sarı arasında olmalıdır. Mavi bir rengin oluşması reaktif kontaminasyonu veya instabiliteye işaret edebilir.
- Kalite kontrol malzemeleri, hasta örneklerinin özelliklerini taklit eder ve immünokimyasal testlerin sistem performansını izlemek için gereklidir. En azından analitin iki düzeyini kapsayan KK veya piyasada bulunan diğer kalite kontrol materyallerini ekleyin. Kontrollerin daha sık kullanılması veya ek kontrollerin kullanılması, iyi laboratuvar uygulamaları ya da laboratuvar akreditasyon şartları ve ilgili yasaların gerektirdiği koşullara bağlı olarak kullanıcının kararına

birakılır. Hazırlama ve saklama için üreticinin talimatlarını izleyin. Her laboratuvar uygun performansı sağlamak için ortalama değerleri ve kabul edilebilir aralıkları oluşturmalıdır. Kabul edilebilir aralıklarda yer almayan kalite kontrol sonuçları geçersiz test sonuçlarını gösterebilir.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

(daha fazla bilgi için ekteki "APPENDIX-EK" veri formuna bakınız)

Temsili veriler yalnızca örnek olarak verilmiştir. Her bir laboratuvarında elde edilen performans farklılık gösterebilir.

Duyarlılık

Tespit Limiti (LoD): 2,61 pg/mL

Özgüllük

İmmünoanalizde kullanılan antikor yüksek düzeyde İnhibin A'ya özgüdür.

Kesinlik

Deney-içi

Numuneler, aynı seri içinde 25 kez denenmiştir. Serum numuneleri için değişim katsayısı % 4,6 e eşit veya altında bulunmuştur.

Testler arası

Örnekler 10 farklı seride çift olarak analiz edilmiştir. Varyasyon katsayıları serum örnekleri için %6,9'un altında ya da bu değere eşit bulunmuştur.

Doğruluk

Düzeltilme testi

Yüksek konsantrasyonlu numuneler seri olarak sıfır kalibratör ile dilüe edildi. Düzeltme oranı % 97,8 ile % 117 arasında bulunmuştur.

Düzeltilme testi

Düşük konsantrasyonlu örnekler bilinen İnhibin A miktarları ile spayklanmıştır. Elde edilen geri kazanım yüzdeleri %83,5 ile %99,5 arasındadır.

Ölçüm aralığı (Tespit limitinden en yüksek kalibratöre kadar): 2,61 ila yaklaşık 1.000 pg/mL.

SINIRLAMALAR

- Bu kitle verilen reaktifler serum veya plazmadaki inhibin A seviyelerini ölçmek üzere optimize edilmiştir.
- Antikorların kullanıldığı testlerde, örnekteki heterofil antikorlarla etkileşim olasılığı vardır. Sürekli olarak hayvanların olduğu ortamda bulunan veya immünoglobulinler ya da immünoglobulin fragmentlerinin kullanıldığı immünoterapi veya tanısal prosedürler alan bireylerin örnekleri, HAMA gibi immünoanalizlerle etkileşen antikorlar üretebilir. Ayrıca, örneklerde insan anti-keçi antikorları gibi başka heterofil antikorlar da bulunabilir.^{22,23} Etkileşime giren bu tür antikorlar hatalı sonuçlar üretebilir. Bu antikorlara sahip olduğundan şüphe duyulan hastaların sonuçlarını dikkatle değerlendirin.
- Bir reaktifte mikrobik kontaminasyon veya aşırı bulanıklık belirtisi varsa şişeyi atın.
- İnhibin A ELISA sonuçları, hastanın semptomları, klinik öyküsü, ilave testlerden alınan veriler ve diğer uygun bilgiler gibi genel klinik durumu dikkate alınarak yorumlanmalıdır.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, Набор твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) для ингибина А содержит материалы для количественного измерения димерного ингибина А в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен исключительно для использования *in vitro* как вспомогательное средство диагностики и контроля различных гормональных нарушений репродуктивной функции. Скрининг на Синдром Дауна (трисомия 21) на 2 триместре с использованием комбинированных биохимических и ультразвуковых маркеров может оцениваться с соответствующими алгоритмами, выполняемыми на коммерчески доступном программном обеспечении расчета рисков.^{24, 25} Настоятельно рекомендуется использовать одобренное (с маркировкой CE) программное обеспечение, предназначенное специально для оценки риска трисомии 21, например, программное обеспечение alpha.* Набор ингибина А предназначен для использования в сочетании с hAFP + hCG + uE3.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Ингибины представляют собой гетеродимерные белковые гормоны, секретируемые гранулезными клетками женских яичников и клетками Сертоли яичек у мужчин. Они селективно подавляют секрецию гипофизарного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и оказывают локальное паракринное воздействие на гонады.^{1,2}

Молекулярная масса полностью обработанной формы молекулы ингибина соответствует приблизительно 32 кД и состоит из двух отдельных цепей (α и β), соединенных дисульфидными связями. Формы с большей молекулярной массой, с прекурсорными формами α -субъединицы, также обнаруживаются в фолликулярной жидкости и сыворотке крови. Кроме того, также присутствуют свободные формы α -субъединицы, не связанные с β -субъединицей и не демонстрирующие биологическую активность ингибина.^{3,4,5,6}

Ингибин А состоит из α -субъединицы и β -субъединицы. Показано, что измерения ингибина А полезны при изучении его роли в репродуктивной физиологии человека.^{7,8,9} Несколько опубликованных отчетов указывают на возможность использования измерений ингибина А как эндокринного маркера для контроля функции яичников.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Да недавних пор было невозможно различать циркулирующий функциональный димерный ингибин и свободную α -субъединицу при нормальном менструальном цикле у женщин.

Однако путем использования хорошо описанной пары антител двухсайтный «сэндвич»-анализ ELISA способен специфическим образом измерять только димерный ингибин А.¹⁸

ПРИНЦИП

Метод ELISA для ингибина А представляет собой двухсайтный «сэндвич»-анализ с ферментным усилением. В этом анализе калибраторы, контрольные материалы и пробы инкубируют в ячейках микропланшетов для титрования, покрытых антителом к β субъединице ингибина. После инкубирования и отмывки в каждую ячейку добавляют антитело для обнаружения альфа-субъединицы ингибина, маркированное пероксидазой хрена (HRP). После второго этапа инкубирования и отмывки в ячейки добавляют субстрат титраметилбензидин (ТМБ).

Наконец, добавляется кислый останавливающий раствор. Степень ферментного обмена субстрата определяется измерением поглощения на двух длинах волн на 450 нм и между 600 и 630 нм. Измеренное поглощение прямо пропорционально концентрации ингибина А в пробах. Набор калибраторов ингибина А используется для построения стандартной кривой поглощения относительно концентрации ингибина А. Концентрации ингибина А в пробах могут быть рассчитаны по этой стандартной кривой.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для диагностики *in vitro*.

Соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики.¹⁹

При соблюдении описанной процедуры риск работы с пробами и препаратами крови минимален. Однако с этими продуктами необходимо обращаться как с потенциально инфекционно-опасными, соблюдая универсальные меры предосторожности и правила надлежащей лабораторной практики вне зависимости от их происхождения, обработки и предшествующей сертификации.²⁰ Для дезинфекции используйте соответствующее дезинфицирующее средство. Храните и утилизируйте данные материалы и контейнеры из-под них в соответствии с местными предписаниями и руководствами.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Calibrators / Controls ОСТОРОЖНО!



H317

Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

H412

Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.

P273

Не допускать попадания в окружающую среду.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

P333+P313

При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.

P362+P364

Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием. реакционная смесь из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин -3-он [EC № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-он [EC № 220-239-6](3:1) <0,05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate ОСТОРОЖНО!



H316

Вызывает незначительное раздражение кожи.

H317

Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

H412

Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.

P273

Не допускать попадания в окружающую среду.

P280







Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.


P332+P313

При раздражении кожи: обратиться к врачу.

P333+P313

При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.

Sample Buffer A	P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием. 3-(N-морфолино)-2-гидроксипропансульфоновой кислоты натриевая соль 1 - 2% реакционная смесь из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 220-239-6](3:1) <0,05%	P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.	
			P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием. Комплекс пероксида водорода и мочевины 10 - 20% реакционная смесь из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 220-239-6](3:1) < 0,05%	
	ОПАСНО!		Conjugate Diluent	ОПАСНО!	
					
	H316	Вызывает незначительное раздражение кожи.			
	H318	Вызывает серьезные повреждения глаз.			
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.			
	P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.		H316	Вызывает незначительное раздражение кожи.
	P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.		H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
	P332+P313	При раздражении кожи: обратиться к врачу. Натрия лаурилсульфат 1 - < 3% Трис (гидроксиметил) - aminomethane (аминометан) 1 - 2% Спирт, С12-14-вторичный, этоксилированный 3 - 5%		H318	Вызывает серьезные повреждения глаз.
Sample Buffer B				H412	Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
				P273	Не допускать попадания в окружающую среду.
	ОПАСНО!			P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
				P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
				P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.
	H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.		P333+P313	При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
	H317	Может вызывать аллергическую кожную реакцию.		P362+P364	Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.			Трис (гидроксиметил) - aminomethane (аминометан) 1 - 3% Спирт, С12-14-вторичный, этоксилированный 3 - 5% реакционная смесь из 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 247-500-7] и 2-метил-4-изотиазолин -3-он [ЕС № 220-239-6](3:1) < 0,05%
	P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.			
	P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.		Стоп-раствор А	ОПАСНО!
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу.				

	H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	P301+P330+P331	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: прополоскать рот, НЕ вызывать рвоту.
	P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): промыть кожу водой.
	P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промывать водой несколько минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжить промывание.
	P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. Серная кислота 1 - 3%
Wash solution (20x)	ОПАСНО!	
		
	H360	Может привести к нарушению репродуктивной функции или нанести вред ребенку в утробе матери.
	P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
	P280	Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.
	P308+P313	ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью. Борная кислота 0,1 - 0,3% Натрия борат, декагидрат 0,1 - 0,3%

- При центрифугировании следуйте рекомендациям производителя пробирок для сбора крови.

В каждой лаборатории следует установить пригодность используемых пробирок для сбора крови и продуктов разделения сыворотки. Данные продукты могут различаться в зависимости от производителя или партии.

Избегайте повторных цикло замораживания/оттаивания образцов.

Избегайте анализа липемических, иктерических или гемолизированных образцов.

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор для определения ингибина А: 96 ячеек (Кат. № DSL-10-28100T-1)

Микротитрационные полоски, покрытые антителом к ингибину А: Один держатель полосок, содержащий 96 ячеек для микротитрования.

Полистироловые ячейки титрационного микропланшета с антителом к ингибину β_A , иммобилизованным на внутренней поверхности каждой ячейки.

Хранить при 2-8°C до окончания срока годности, в плотно закрытом оригинальном пакете с осушителем, для защиты от влажности.

Концентрат конъюгата антитела к ингибину А-фермента: один флакон 0,6 мл

Конъюгат мышинового моноклонального антитела к α -субъединице ингибина и HRP, MOPSO, BSA и < 1,0% ProClin** 300.

Хранить при 2-8°C до окончания срока годности.

Разведите, прежде чем использовать разбавитель конъюгата.

Калибраторы: Шесть флаконов по 1 мл и один флакон 2 мл «нулевого» калибратора (готовы к использованию)

Концентрации приблизительно 0, 10, 30, 100, 250, 500 и 1 000 пг/мл рекомбинантного димерного ингибина А в бычьей сыворотке с < 0,5% ProClin 300.

Точные значения концентрации см. на этикетках флаконов.

Невскрытый реагент хранится при 2-8°C до окончания срока годности.

Стабилен при 2-8°C в течение 28 дней после первичного использования. Для более длительного хранения хранить при -20°C в морозильной камере (от -15°C до -24°C) до истечения срока годности.

Измеряемая величина (аналит) в калибраторах ингибина А прослеживается до первого международного стандарта Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для ингибина-А (код 91/624), содержащего рекомбинантный человеческий ингибин А 32 кДа (1 пг/мл или 0,037 МЕ/мл). Заданные значения были получены при анализе репрезентативных проб из этой партии калибратора и являются специфическими для методик количественного определения реагентов. Значения, полученные с помощью других методов, могут отличаться. Эти различия могут быть обусловлены отклонениями, вызванными отличиями методов.

Контрольные материалы: два флакона по 1,0 мл (готовы к использованию)

Низкая и высокая концентрации рекомбинантного димерного ингибина А в бычьей сыворотке с < 0,5% ProClin 300.

Ожидаемые диапазоны концентраций указаны на вкладыше.

Невскрытый реагент хранится при 2-8°C до окончания срока годности.

Стабилен при 2-8°C в течение 28 дней после первичного использования. Для более длительного хранения хранить при -20°C в морозильной камере (от -15°C до -24°C) до истечения срока годности.

Буфер А пробы: один флакон 10,0 мл

Буфер с альбумином бычьей сыворотки (BSA), животной сывороткой (козьей, мышиной), сурфактантом и натрия азидом.

Хранить при 2-8°C до окончания срока годности.

Буфер В пробы: один флакон 10,0 мл


Буфер с < 20% гидроперита, < 0,5% ProClin 300 и азидом натрия.

Хранить при 2-8°C до окончания срока годности.

Раствор хромогена ТМВ: один флакон 11,0 мл

Тетраметилбензидин (ТМВ) в цитратном буфере с перекисью водорода.

Хранить при 2-8°C до окончания срока годности.

 Паспорт безопасности доступен на сайте beckmancoulter.com/techdocs

ПОЛУЧЕНИЕ, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Рекомендуемыми пробами являются сыворотка и плазма.

При обработке и хранении проб крови необходимо соблюдать следующие инструкции:²¹

- Соберите все пробы крови, соблюдая установленные меры предосторожности при венопункции.
- Храните пробирки все время закупоренными.
- В течение двух часов после центрифугирования перенесите по меньшей мере 500 мкл пробы без клеток в пробирку для хранения. Немедленно плотно закупорьте пробирку.
- Хранить неразведенные или разведенные пробы в плотно закупоренных флаконах при температуре 2-8°C не более 24 часов.
- Если анализ не будет завершен в течение 24 часов, а также для транспортировки, заморозьте пробы при -20°C или ниже для хранения в течение времени до 30 дней.

При подготовке образцов соблюдайте следующие рекомендации:

- Убедитесь в том, что образцы не содержат фибрина и клеточных элементов перед проведением анализа.

Останавливающий раствор А: один флакон 11,0 мл

0,2 М серная кислота.

Хранить при 2-8°C или при комнатной температуре (18-25°C) до окончания срока годности

Дилуент конъюгата: один флакон 15,0 мл

Буфер с BSA, животной сывороткой (козьей, мышьиной), сурфактантом и < 1,0% ProClin 300.

Хранить при 2-8°C до окончания срока годности.

Промывочный раствор У (20X): Один флакон 50 мл

Концентрированный раствор должен быть разведен перед использованием.

Хранить при 2-8°C или при комнатной температуре (18-25°C) до окончания срока годности

Набор для определения ингибина А: 384 ячейки (Кат. № DSL-10-28100T-4)is>

Микротитрационные полоски, покрытые антителом к ингибину А: Четыре держателя полосок, каждый из которых содержит 96 ячеек для микротитрования.

Концентрат конъюгата антитела к ингибину А–фермента: четыре флакона по 0,6 мл

Калибраторы: двенадцать флаконов по 1 мл и два флакона по 2 мл «нулевого» калибратора (готовы к использованию)

Контрольная сыворотка: четыре флакона по 1,0 мл (готова к использованию)

Буфер А пробы: четыре флакона 10,0 мл

Буфер В пробы: три флакона 10,0 мл

Раствор хромогена ТМВ: один флакон 50,0 мл

Останавливающий раствор А: четыре флакона по 11,0 мл

Дилуент конъюгата: четыре флакона по 15,0 мл

Промывочный раствор (20X): 2 флакона по 50 мл

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Помимо стандартного лабораторного оборудования необходимо иметь следующее:

- Устройство для считывания микропланшетов для титрования, способное измерять поглощение на 450 нм и, предпочтительно, способное выполнять коррекцию на второй длине волны, между 600 и 630 нм
- Деионизированная вода
- Прецизионная пипетка для ввода 50–100 мкл
- Устройство для встряхивания титрационного микропланшета, способное выполнить 500–700 орбитальных оборотов в минуту (об/мин)
- Микропланшетный вошер
- Вортекс
- Фильтровальная бумага
- Графическая бумага для обработки результатов вручную

ПРОЦЕДУРА

Замечания по процедуре

- Необходимо внимательно изучить этот вкладыш в упаковку для успешного использования метода ELISA для ингибина А.
- Пользователь обязан самостоятельно подтверждать достоверность выполняемых исследований.
- Правильные результаты будут получены только при использовании точной лабораторной техники и строгом выполнении данной инструкции.
- Анализ калибровочных проб должен проводиться одновременно с исследуемыми образцами.
- Перед использованием все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (18-25°C).

- Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, осторожно переворачивая.
- Не смешивайте какие-либо реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов.
- Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации с субстратом, вносите стоп-раствор в лунки в той же последовательности и с такой же скоростью, как и раствор ТМВ.
- С осторожностью работайте со всеми реагентами во избежание микробиологического загрязнения, которое может повредить реагенты, особенно разбавитель конъюгата и буфер А пробы.
- Не допускайте загрязнения раствора хромогена ТМВ конъюгатом.
- Используйте чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта, контроля и образца.
- Для добавления хромогенного раствора ТМВ и стоп-раствора не используйте пипетки с металлическими частями.
- Фермент, используемый в качестве метки, инактивируется кислородом, и он крайне чувствителен к микробиологическим загрязнениям, хлорноватистой кислоте, азиду натрия и ароматическим хлоруглеводородам, часто присутствующим в воде. Используйте воду высокого качества.
- Используйте деионизированную воду.
- Избегайте контакта реагентов с источниками тепла и прямым солнечным светом при хранении реагентов и во время инкубации.

Подготовка реагентов

1. **Промывочный раствор:** выливают содержимое флакона в 950 мл дистиллированной воды и гомогенизируют. Разведенный раствор можно хранить при температуре 18–25°C один месяц или при 2–8°C до истечения срока годности набора.
2. **Раствор конъюгата антитело-фермент Inhibin А:** Концентрат конъюгата Inhibin А следует разводить в соотношении 1 часть к 50 частям разводителя конъюгата Inhibin А в соответствии с количеством используемых лунок. Для заполнения целого планшета внесите пипеткой точно 220 µL концентрата конъюгата антитело-фермент Inhibin А в 11 mL разбавителя конъюгата.
ПРИМЕЧАНИЕ: разводить Концентрат конъюгата Inhibin А следует за 10-15 минут до использования.
3. **Лунки микропланшета:** Возьмите необходимое количество лунок для текущей постановки. Оставшиеся не используемые лунки необходимо вернуть в пакет с осушителем и тщательно закрыть пакет, для защиты от попадания влаги.

Процедура анализа

Дайте всем образцам и реагентам достичь комнатной температуры (18-25°C). Перед использованием тщательно перемешайте реагенты, осторожно переворачивая. После восстановления смешайте реагенты, избегая образования пены. Следует проводить анализ калибраторов, контрольных и исследуемых образцов в двух сериях.

1. Надпишите используемые стрипы.
2. Внесите пипеткой 50 µL калибровочных, контрольных и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте 50 мкл буфера А пробы в каждую ячейку прецизионной пипеткой.
4. Добавьте 50 мкл буфера В пробы в каждую ячейку прецизионной пипеткой.
5. Инкубируйте лунки в орбитальном аппарате для встряхивания микропланшетов при 500–700 грт в течение трех часов при комнатной температуре (18-25°C).
6. Приготовьте раствор конъюгата антитело-фермент путем разведения концентрата конъюгата антитело-фермент в разбавителе конъюгата Inhibin А, как описано в разделе "Подготовка реагентов" данного листка-вкладыша.
7. Аспирируйте и отмойте каждую лунку шесть раз раствором для отмывания, используя автоматический аппарат для отмывания планшетов или вручную с помощью точной пипетки. Промокните и высушите планшет, опрокинув его в абсорбирующий материал.

ПРИМЕЧАНИЕ: Настоятельно рекомендуется пользоваться автоматическим аппаратом для отмывания микропланшетов. Неполное отмывание может оказать неблагоприятное влияние на и точность анализа. В случае отсутствия автоматического аппарата для отмывания микропланшетов следуйте следующим этапам для отмывания вручную:

- (а) Полностью аспирируйте жидкость из каждой лунки
 - (б) Внесите по 350 µL раствора для отмывания в каждую лунку с помощью точной пипетки
 - (с) Снова аспирируйте жидкость
 - (д) Повторите этапы (б) и (с) пять раз
8. Добавьте 100 µL раствора конъюгата антитело-фермент в каждую лунку с помощью точной пипетки.
 9. Инкубируйте лунки в орбитальном аппарате для встряхивания микропланшетов при 500–700 грт в течение одного часа при комнатной температуре (18-25°C).
 10. Аспирируйте и отмойте каждую лунку шесть раз раствором для отмывания с помощью автоматического аппарата для отмывания микропланшетов. Промокните и высушите планшет в абсорбирующем материале.
 11. Добавьте 100 µL раствора хромогена ТМВ в каждую лунку с помощью точной пипетки.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей.

12. Инкубируйте лунки в орбитальном аппарате для встряхивания микропланшетов при 500–700 грт в течение 15 минут при комнатной температуре (18-25°C).

ПРИМЕЧАНИЕ: Учтите, что изменение цвета может развиваться быстрее или медленнее, чем в рекомендованные сроки инкубации, в зависимости от температуры в помещении. Для выбора оптимального срока инкубации следите за изменением цвета визуально.

13. Добавьте 100 µL останавливающего раствора в каждую лунку с помощью точной пипетки.
14. Выполните считывание поглощения в ячейках в течение 30 минут, используя считыватель микропланшетов, настроенный на 450 нм.

ПРИМЕЧАНИЕ:

- 1) Во время регистрации поглощения в лунке микроплшета необходимо запрограммировать нулевой калибратор как "Пусто".
- 2) Если доступна корректировка длины волны, настройте прибор на измерение на двойной длине волны на 450 нм с заданной корректировкой фоновой волны от 600 до 630 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Рассчитайте среднее значение поглощения для каждого калибратора, контрольного образца или пробы.
2. Постройте график логарифма средних значений поглощения для каждого из калибраторов по оси у относительно логарифма концентраций ингибина А в пг/мл по оси х, используя подбор линейной кривой. Вместо этого можно строить график линейных значений относительно линейных значений и использовать подбор сглаженной кривой «сплайн».
3. Постройте наилучшую эмпирическую кривую через среднее значение дублирующихся точек.
4. Определите концентрации ингибина А контрольных материалов и проб по стандартной кривой, сопоставив их средние значения поглощения с соответствующими концентрациями ингибина А.
5. Все пробы со значениями больше значения наибольшего калибратора следует надлежащим образом разводить с использованием калибратора А ингибина А и анализировать повторно.
6. Все образцы к концентрацией ниже аналитической чувствительности метода должны быть представлены как «ниже аналитической чувствительности метода».
7. Если необходимо, умножьте значение, полученное из калибровочной кривой, на соответствующий коэффициент разведения.

ПРИМЕЧАНИЕ. Если значения поглощения превышают ограничения считывателя планшетов, требуется второе считывание на 405 нм

(референсный фильтр между 600 и 630 нм, если доступен). В этом случае выполните построение второй стандартной кривой, как показано выше, со значениями поглощения всех стандартов на 405 нм. Концентрация проб, выходящих за пределы шкалы на 450 нм, затем определяется по новой стандартной кривой. Значения на 405 нм не должны заменять собой не выходящие за пределы шкалы значения на 450 нм.

Калибровочная кривая

Калибраторы	Концентрация (пг/мл)	A	B/B _{макс} (%)
0	0,00	0,022 (бланк)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Пример типичной калибровочной кривой. Не использовать для обсчета результатов.)

Образцы

Для преобразования МЕ/мл используйте следующее уравнение:

$$1 \text{ МЕ/мл (ВОЗ 91/624)} = 26,7 \text{ пг/мл}$$

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В каждой лаборатории следует установить собственные референсные интервалы в целях обеспечения единообразия результатов. Следующие представленные значения были получены с ELISA для ингибина А с использованием проб сыворотки от клинически здоровых взрослых субъектов. Все значения сообщаются в пг/мл. Для женщин с нормальным циклом числа под каждой фазой представляют дни до и после выброса LH.

Популяция	n	Среднее	Средняя	95% доверительный интервал
Женщины с нормальным менструальным циклом				
Ранняя фолликулярная фаза (от -14 до -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Средняя фолликулярная фаза (от -9 до -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Поздняя фолликулярная фаза (от -3 до -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Середина цикла (день 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Ранняя лютеиновая фаза (от 1 до 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Средняя лютеиновая фаза (от 4 до 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Поздняя лютеиновая фаза (от 12 до 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Максимальные концентрации IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1 690
СПКЯ — овуляторная форма	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Постменопауза	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Здоровые мужчины	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

†Уровни ингибина А ниже стандарта G экстраполированы.

Значения, представленные в следующей таблице, представляют концентрацию ингибина А в сыворотке матери на втором триместре.

Полная неделя	Число проб	Медианный ингибин А (пг/мл)	LOG ₁₀ CO
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Таблица со значениями, предоставленными скрининговым центром в США (2005).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Контрольные материалы ELISA для ингибина А или другие коммерческие контрольные материалы должны попадать в установленные доверительные пределы.
- Доверительные пределы для контрольных образцов ELISA ингибина А указаны на вкладыше.
- В каждый анализ требуется включать полную стандартную кривую, а также контрольные материалы низкой и высокой концентрации.
- Раствор хромогена ТМВ должен быть бесцветным или светло-желтым. Появление голубого окрашивания может указывать на контаминацию или нестабильность реагента.
- Контрольные материалы имитируют характеристики проб пациентов и имеют важнейшее значение для контроля характеристик системы иммунологического анализа. Используйте QC или другие доступные для приобретения материалы контроля качества, которые покрывают как минимум два уровня аналита. Более частое проведение контрольных анализов или использование дополнительных методов контроля является прерогативой пользователя системы с учетом требований хорошей лабораторной практики, лабораторной аккредитации и действующего законодательства. Для восстановления концентрации и хранения следуйте инструкциям производителя. В каждой лаборатории следует установить средние значения и приемлемые диапазоны в целях проверки соответствующих рабочих параметров. Результаты контроля качества, не соответствующие приемлемому диапазону, могут указывать на ошибочные результаты тестирования.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(Более подробная информация приведена в разделе "APPENDIX")

Репрезентативные данные предоставлены исключительно для пояснений. Показатели, полученные в конкретной лаборатории, могут отличаться.

Чувствительность

Предел чувствительности (LoD): 2,61 пг/мл

Специфичность

Антитело, используемое в иммунологическом анализе, является высокоспецифичным для ингибина А.

Воспроизводимость

Внутри анализа

Анализ образцов проводили в 25 репликатах в пределах одной серии определений. Коэффициент вариации измеренных уровней в сыворотке крови не превышал 4,6%.

Между анализами

Анализ образцов в дубликатах проводили в 10 различных сериях определений. Коэффициент вариации измеренных уровней в сыворотке крови не превышал 6,9%.

Точность

Тест на разведение

Образцы сыворотки крови с высоким уровнем серийно разводили нулевой калибровочной пробой. Процент "открытия" составил 97,8% - 117%.

Тест на открытие стандартной добавки

В пробы с низкой концентрацией ингибина А были добавлены известные количества его. Полученные значения процента извлечения составили от 83,5% до 99,5%.

Диапазон измерений (от предела чувствительности до наибольшего калибратора): от 2,61 до приблизительно 1 000 пг/мл.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Реагенты, содержащиеся в данном наборе, оптимизированы для измерения концентраций ингибина А в сыворотке или плазме.
- Для анализов, использующих антитела, существует вероятность интерференции гетерофильными антителами в пробе. Пробы у пациентов, имеющих постоянный контакт с животными, или проходивших иммунотерапию, или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут содержать антитела (т.е. НАМА), которые влияют на результаты иммунного анализа. Кроме того, в пробах могут присутствовать прочие гетерофильные антитела (например, человеческие антикозьи антитела).^{22,23} Интерференция с этими антителами может привести к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты анализов пациентов с подозрением на наличие этих антител.
- При признаках бактериального загрязнения или повышенной мутности реагента флакон необходимо выбросить.
- Результаты ELISA для ингибина А должны интерпретироваться с учетом общих клинических проявлений пациента, включая симптомы, историю болезни, данные дополнительных исследований и прочую информацию.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

DOAR PENTRU UZ PROFESIONAL,

Setul pentru teste de imunoabsorbție enzimatică

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) pentru inhibină A furnizează materiale pentru măsurarea cantitativă a inhibinei A dimerice în ser sau plasmă umană. Acesta este destinat exclusiv pentru utilizare *in vitro* ca ajutor în diagnosticarea și monitorizarea diverselor tulburări hormonale reproductive. Screeningul de sindrom Down (trisomie 21) în al 2-lea trimestru folosindu-se markeri biochimici și de ultrasunete combinați poate fi evaluat cu algoritmi adecvați, care pot fi rulați pe software-uri de calculare a riscului disponibile în comerț.^{24, 25}

Se recomandă cu insistență utilizarea unui software-uri validat (cu marcaj CE) desemnat în mod special pentru evaluarea riscului de trisomie 21, de exemplu software-ul alpha.* Setul pentru inhibină A este destinat utilizării în combinație cu hAFP + hCG + uE3.

REZUMAT

Inhibinele sunt hormoni proteici heterodimerici secretați de către celulele granulose ale ovarului la femeie și de către celulele Sertoli din testicule la bărbat. Acestea suprimă selectiv secreția hormonului pituitar de stimulare foliculară (FSH) și au, de asemenea, acțiuni locale paracrine în gonade.^{1,2}

Forma complet procesată a moleculei de inhibină are o masă moleculară de aproximativ 32 kDa și este compusă din două catene distincte (α și β), legate prin punți de disulfură. Formele cu masă moleculară mai mare, cu forme precursorale ale subunității α , apar, de asemenea în lichidul folicular și în ser. În plus, sunt, de asemenea, prezente forme de subunități α libere, neasociate cu o subunitate β și reprezentând bioactivitate a inhibinei.^{3,4,5,6}

Inhibina A este compusă dintr-o subunitate α și o subunitate β_A . Măsurătorile de inhibină A s-au dovedit a fi utile în studiile legate rolul său în fiziologia reproducerii umane.^{7,8,9} Mai multe rapoarte publicate indică utilitatea măsurării inhibinei A ca marker endocrin pentru monitorizarea funcției ovariene.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Până de curând, nu a fost posibil să se facă distincția dintre inhibina dimerică funcțională circulantă și subunitatea α liberă în ciclul menstrual uman normal.

Cu toate acestea, prin utilizarea perechii de anticorpi foarte caracterizate, s-a constatat că testul ELISA cu doi anticorpi („sandwich”) este capabil să măsoare în mod specific numai inhibina A dimerică.¹⁸

PRINCIPIU

ELISA pentru inhibină A este un test în două etape („sandwich”) amplificat enzimatic. În testare, calibratoare, controalele și probele se incubează în godeuri pentru microtitrare care au fost acoperite cu anticorp de subunitate β_A anti-inhibină. După incubare și spălare, în fiecare godeu se adaugă anticorp de detecție a subunității alfa anti-inhibină etichetat cu peroxidază din hrean (HRP). După o a doua etapă de incubare și spălare, în godeuri se adaugă substratul tetrametilbenzidină (TMB).

În cele din urmă, se adaugă o soluție acidă de stopare. Gradul de fluctuație enzimatică a substratului este determinat prin măsurarea duală a absorbției lungimii de undă la 450 nm și între 600 nm și 630 nm. Absorbția măsurată este direct proporțională cu concentrația de inhibină A din probe. Pentru trasarea unei curbe standard de absorbție în raport cu concentrația de inhibină A se folosește un set de calibratoare de inhibină A. Concentrațiile de inhibină A din probe pot fi apoi calculate din această curbă standard.

AVERTIZĂRI ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

Pentru utilizare în diagnosticarea *in vitro*.

Utilizați bune practici de laborator.¹⁹

Probele și produsele derivate din sânge pot fi procesate în mod obișnuit, cu riscuri minime, utilizându-se procedura descrisă. Cu toate acestea, manipulați aceste produse ca fiind potențial infecțioase în conformitate cu măsurile de precauție universal valabile și bunele practici de laborator clinic, indiferent de originea, tratarea sau certificarea lor prealabilă.²⁰ Pentru decontaminare, utilizați un dezinfectant corespunzător. Depozitați și eliminați aceste materiale și recipientele acestora în conformitate cu reglementările locale și cu instrucțiunile.

CLASIFICAREA RISCURILOR ÎN SISTEMUL GHS

Calibrators / Controls

ATENȚIE



H317

Poate produce o reacție alergică la nivelul pielii.

H412

Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.

P273

Evitați dispersarea în mediu. Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.

P280

P333+P313

În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: solicitați sfat medical sau îngrijire medicală.

P362+P364

Scoateți îmbrăcăminte contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. amestec de: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 247-500-7] și 2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 220-239-6](3:1) <0,05%

Antibody Enzyme

ATENȚIE

Conjugate Concentrate



H316

Provoacă iritații cutanate ușoare.

H317

Poate produce o reacție alergică la nivelul pielii.

H412

Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.

P273

Evitați dispersarea în mediu. Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.

P280

P332+P313

În caz de iritare a pielii: solicitați sfat medical/îngrijire medicală.

P333+P313

În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: solicitați sfat medical sau îngrijire medicală.

P362+P364

Scoateți îmbrăcăminte contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Acid 3-(N-morfolino)-2-hidroxi propan sulfonic, sare de sodiu 1 - 2% amestec de: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 247-500-7] și 2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 220-239-6](3:1) <0,05%

Sample Buffer A

PERICOL



H316







Provoacă iritații cutanate ușoare.

H318

Provoacă vătămarea gravă a ochilor.

P280

Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.

Sample Buffer B	P305+P351+P338	ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.		P273 P280	Evitați dispersarea în mediu. Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.
	P310	Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.		P305+P351+P338	ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.
	P332+P313	În caz de iritare a pielii: solicitați sfat medical/îngrijire medicală. Laurilsulfat de sodiu 1 - < 3% Tris (hidroximetil) – aminometan 1 - 2% Alcool, C12-14-secundar, etoxilat 3 - 5%		P310	Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.
				P333+P313	În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: solicitați sfat medical sau îngrijire medicală.
				P362+P364	Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Tris (hidroximetil) – aminometan 1 - 3% Alcool, C12-14-secundar, etoxilat 3 - 5% amestec de: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 247-500-7] și 2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 220-239-6](3:1) < 0,05%
	PERICOL				
					
					
	H314	Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor.			
	H317	Poate produce o reacție alergică la nivelul pielii.			
P280	Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.	Soluție inhibatoare A	PERICOL		
P303+P361+P353	ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): Clătiți pielea cu apă.		H314	Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor.	
P305+P351+P338	ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.		P280	Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.	
P310	Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.		P301+P330+P331	ÎN CAZ DE ÎNGHIȚIRE: clătiți gura. NU provocați vomă.	
P333+P313	În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: solicitați sfat medical sau îngrijire medicală.		P303+P361+P353	ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): Clătiți pielea cu apă.	
P362+P364	Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Peroxid de hidrogen și uree 10 - 20% amestec de: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 247-500-7] și 2-metil-4-izotiazolin-3-onă [nr. CE 220-239-6](3:1) < 0,05%	Wash solution (20x)	P305+P351+P338	ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.	
			P310	Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic. Acid sulfuric 1 - 3%	
			PERICOL		
					
Conjugate Diluent	PERICOL				
					
					
	H316	Provoacă iritații cutanate ușoare.		H360	Poate dăuna fertilității sau fătului.
	H317	Poate produce o reacție alergică la nivelul pielii.		P201	Obțineți instrucțiuni speciale înainte de utilizare.
	H318	Provoacă vătămarea gravă a ochilor.		P280	Purtați mănuși de protecție, îmbrăcăminte de protecție și echipament de protecție pentru ochi/față.
H412	Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.		P308+P313	ÎN CAZ DE expunere sau posibilitate de expunere: solicitați sfat medical/îngrijire medicală. Acid boric 0,1 - 0,3% Borat de sodiu decahidrat 0,1 - 0,3%	

COLECTAREA, PROCESAREA, DEPOZITAREA ȘI DILUAREA PROBELOR

Serul și plasma sunt probele recomandate.

Respectați următoarele recomandări pentru manipularea, procesarea și păstrarea probelor de sânge:²¹

- Colectați toate probele de sânge respectând precauțiile de rutină pentru puncția venoasă.
- Păstrați întotdeauna eprubetele închise ermetic.
- În interval de două ore de la centrifugare, transferați cel puțin 500 µl de probă fără celulă într-o eprubetă de depozitare. Acoperiți imediat eprubeta cu un capac etanș.
- Depozitați probele nediluate sau diluate bine închise la 2°C–8°C timp de cel mult 24 de ore.
- Dacă testarea nu se finalizează în decurs de 24 de ore sau în scopul livrării de probe, congelați la -20°C sau la temperatură mai scăzută timp de până la 30 de zile.

Utilizați următoarele indicații la pregătirea probelor:

- Asigurați-vă că fibrina reziduală și materia celulară au fost eliminate înainte de analiză.
- Respectați recomandările producătorului eprubetelor de colectare a sângelui pentru centrifugare.

Fiecare laborator trebuie să determine acceptabilitatea propriilor eprubete de colectare a sângelui și a produselor de separare a serului. Variațiile acestor produse ar putea exista în funcție de producători și uneori de la lot la lot.

Evitați congelarea și decongelarea repetată a probelor.

Evitați testarea probelor lipemice, icterice sau hemolizate.

MATERIALE FURNIZATE

Set pentru determinarea inhibinei A: 96 godeuri (nr. cat. DSL-10-28100T-1)

Benzi pentru microtitrare acoperite cu anticorp anti-inhibină A: Un suport de benzi conținând 96 de godeuri pentru microtitrare.

Godeuri pentru microtitrare din polistiren cu anti-inhibină β_A imobilizată pe peretele interior al fiecărei godeu.

Păstrați la 2°C–8°C până la data de expirare în punga resigilabilă cu un desicant pentru protecție împotriva umidității.

Concentrat de conjugat anticorp-enzimă inhibină A: o fiolă de 0,6 ml

Conjugat anticorp monoclonal de subunitate α anti-inhibină de șoarece-HRP, MOPSO, BSA și < 1,0% ProClin** 300.

Depozitați la 2°C–8°C până la data de expirare.

Diluati înainte de utilizare în diluant pentru conjugat.

Calibratoare: șase fiole de 1 ml și o fiolă de 2 ml de calibrator „zero” (gata de utilizare)

Concentrații de aproximativ 0, 10, 30, 100, 250, 500 și 1000 pg/ml de inhibină A dimerică recombinantă în ser bovin cu < 0,5% ProClin 300.

Pentru concentrațiile exacte, consultați etichetele de pe fiole.

Depozitați nedeschis la 2°C–8°C până la data de expirare.

Stabil între 2°C și 8°C timp de 28 de zile după utilizarea inițială. Pentru perioade mai lungi, păstrați într-un congelator de -20°C (între -15°C și -24°C) până la data de expirare.

Mărima de măsurat (analitul) din calibratoare de inhibină A este trasabilă la Primul standard internațional pentru inhibină A al Organizației Mondiale a Sănătății (cod 91/624) conținând inhibină A umană recombinantă de 32 kDa (1 pg/ml sau 0,037 UI/ml). Valorile atribuite au fost stabilite utilizându-se probe reprezentative din acest lot de standard și sunt specifice metodologiilor de testare a reactivilor. Valorile atribuite prin alte metodologii pot fi diferite. Astfel de diferențe, dacă sunt prezente, pot fi cauzate de eroarea sistematică dintre metode.

Controale: două fiole de 1,0 ml (gata de utilizare)

Concentrații scăzute și ridicate de inhibină A dimerică recombinantă în ser bovin cu < 0,5% ProClin 300.

Valorile așteptate sunt indicate pe un supliment din intervalul de concentrații.

Depozitați nedeschis la 2°C–8°C până la data de expirare.

Stabil între 2°C și 8°C timp de 28 de zile după utilizarea inițială. Pentru perioade mai lungi, păstrați într-un congelator de -20°C (între -15°C și -24°C) până la data de expirare.

Tampon pentru probă A: un flacon de 10,0 ml

Tampon cu albumină serică bovină (BSA), ser animal (capră, șoarece), surfactant și azidă de sodiu.

Depozitați la 2°C–8°C până la data de expirare.

Tampon pentru probă B: un flacon de 10,0 ml

Tampon cu < 20% peroxid de hidrogen-uree, < 0,5% ProClin 300 și azidă de sodiu.

Depozitați la 2°C–8°C până la data de expirare.

Soluție de cromogen TMB: un flacon de 11,0 ml

Tetrametilbenzidină (TMB) în tampon de citrat cu apă oxigenată.

Depozitați la 2°C–8°C până la data de expirare.

Soluție de oprire A: un flacon de 11,0 ml

0,2 mol acid sulfuric.

Depozitați la 2°C–8°C sau la temperatura camerei (18-25°C) până la data de expirare.

Diluant pentru conjugat: un flacon de 15, ml

Tampon cu BSA, ser animal (capră, șoarece), surfactant și < 1,0% ProClin 300.

Depozitați la 2°C–8°C până la data de expirare.

Soluție de spălare U (20X): O fiolă de 50 ml

Soluția concentrată trebuie diluată înainte de utilizare.

Depozitați la 2°C–8°C sau la temperatura camerei (18-25°C) până la data de expirare.

Set pentru determinarea inhibinei A: 384 godeuri (nr. cat. DSL-10-28100T-4)

Benzi pentru microtitrare acoperite cu anticorp anti-inhibină A: Patru suporturi de benzi, fiecare conținând 96 de godeuri pentru microtitrare.

Concentrat de conjugat anticorp-enzimă pentru inhibină A: patru fiole de 0,6 ml

Calibratoare: douăsprezece fiole de 1 ml și două fiole de 2 ml de calibrator „zero” (gata de utilizare)

Seruri de control: patru fiole de 1,0 ml (gata de utilizare)

Tampon pentru probă A: patru flacoane de 10,0 ml

Tampon pentru probă B: trei flacoane de 10,0 ml

Soluție de cromogen TMB: un flacon de 50,0 ml

Soluție de stopare A: patru flacoane de 11,0 ml

Diluant pentru conjugat: patru flacoane de 15,0 ml

Soluție de spălare (20X): două fiole de 50 ml

MATERIALE NECESARE, DAR NEINCLUSE

În afară de echipamentul de laborator standard, sunt necesare următoarele articole:

- Cititor de plăci pentru microtitrare capabil să măsoare absorbanta la 450 nmol și, de preferință, capabil de corecție duală a lungimii de undă între 600 nm și 630 nm
- Apă deionizată
- Pipetă de precizie pentru distribuire de volume de 50–100 µl
- Agitator de plăci pentru microtitrare capabil de 500–700 rotații orbitale pe minut (rpm)
- Mașină de spălat pentru plăci pentru microtitrare
- Agitator pentru omogenizare
- Materiale absorbante pentru tamponarea benzilor
- Hârtie grafică pentru reducerea manuală a datelor

PROCEDURĂ

Note de procedură

- Pentru utilizarea cu succes a testului ELISA pentru inhibină A este necesară o înțelegere aprofundată a acestui prospect.
- Este responsabilitatea clientului să valideze testul pentru utilizare.

- Rezultate fiabile vor fi obținute numai prin utilizarea unor tehnici precise de laborator și respectarea cu exactitate a instrucțiunilor din prospect.
- Pentru fiecare test trebuie inclusă o curbă standard.
- Aduceți toți reactivii din set la temperatura camerei (18-25°C) înainte de utilizare.
- Amestecați bine reactivii înainte de utilizare prin răsturnare ușoară.
- Nu amestecați diverse loturi de orice componente ale setului într-un test individual.
- Nu utilizați nicio componentă după data de expirare de pe eticheta sa.
- Spălarea incompletă va afecta în mod negativ rezultatele și precizia testării.
- Pentru a minimiza deriva potențială a testării din cauza variației timpului de incubare a substratului, trebuie avut grijă să se adauge soluția de stopare în godeuri în aceeași ordine și cu aceeași viteză care s-a utilizat pentru adăugarea soluției de cromogen TMB.
- Manipulați cu grijă toți reactivii pentru a evita introducerea de contaminanți microbieni care pot deteriora reactivii, în special diluantul pentru conjugat și tamponul pentru probă A.
- Evitați contaminarea soluției de cromogen TMB cu conjugatele.
- Utilizați un vârf de pipetă de unică folosință curat pentru fiecare reactiv, calibrator, control sau eșantion
- Pentru distribuirea de acid sulfuric și soluție de cromogen TMB, evitați folosirea de pipete cu părți metalice.
- Enzima folosită ca etichetă este inactivată de oxigen și este extrem de sensibilă la contaminare microbiană, azidă de sodiu, acid hipocloros și clorohidrocarburi aromatice găsite adesea în sursele de apă ale laboratoarelor.
- Utilizați apă deionizată.
- Evitați expunerea reactivilor la căldură excesivă sau la lumina directă a soarelui în timpul depozitării și incubării.

Pregătirea reactivilor

1. **Soluție de spălare:** turnați conținutul fiolei în 950 ml de apă distilată și omogenați. Soluția diluată poate fi păstrată la 18°C–25°C timp de o lună sau la 2°C–8°C până la data de expirare a setului.
2. **Soluție de conjugat anticorp-enzimă pentru inhibină A:** concentratul de conjugat anticorp-enzimă pentru inhibină A trebuie diluat la un raport de 1 parte în 50 de părți din diluantul pentru conjugat pentru inhibină A, în funcție de numărul de godeuri utilizate. Pentru o întregă placă, pipetați exact 220 μl de concentrat de conjugat anticorp-enzimă pentru inhibină A în 11 ml de diluant pentru conjugat.
OBSERVAȚIE: concentratul de conjugat anticorp-enzimă pentru inhibină A trebuie diluat proaspăt cu 10–15 minute înainte de utilizare.
3. **Godeuri pentru microtitrare:** selectați numărul de godeuri acoperite necesare pentru testare. Godeurile neutilizate rămase trebuie plasate în punga resigilabilă cu un desicant. Punga trebuie resigilată pentru a asigura protecție împotriva umidității.

Procedură de testare

Permiteți tuturor probelor și reactivilor să ajungă la temperatura camerei (18-25°C). Amestecați bine reactivii prin răsturnare ușoară înainte de utilizare. După reconstituirea reactivilor, amestecați bine, evitând formarea de spumă. Calibratoare, controalele și probele ar trebui testate în duplicat.

1. Marcați benzile pentru microtitrare care trebuie utilizate.
2. Pipetați 50 μl de calibratoare, controale și probe în godeurile corespunzătoare.
3. Adăugați 50 μl de tampon de probă A la fiecare godeu utilizând o pipetă de precizie.
4. Adăugați 50 μl de tampon pentru probă B la fiecare godeu utilizând o pipetă de precizie.
5. Incubați godeurile agitând la 500–700 rpm pe un agitator orbital de microplăci, timp de trei ore, la temperatura camerei (18-25°C).
6. Preparați soluția de conjugat anticorp-enzimă prin diluarea concentratului de conjugat anticorp-enzimă în diluantul pentru conjugat pentru inhibină A așa cum este descris în secțiunea „Prepararea reactivilor” din acest prospect.

7. Aspirați și spălați fiecare godeu de șase ori cu soluția de spălare utilizând o mașină de spălat automată pentru microplăci sau manual, utilizând o pipetă de precizie. Tamponați și uscați inversând placa pe materialul absorbant.

OBSERVAȚIE: se recomandă cu insistență utilizarea unei mașini de spălat automate pentru microplăci. Spălarea incompletă va afecta în mod negativ precizia testării. Dacă nu este disponibilă o mașină de spălat pentru microplăci, urmați acești pași pentru a spăla manual placa:

(a) Aspirați complet lichidul din fiecare godeu

(b) Distribuți 350 μl de soluție de spălare în fiecare godeu utilizând o pipetă de precizie

(c) Aspirați din nou lichidul

(d) Repetați pașii (b) și (c) de cinci ori

8. Adăugați 100 μl de soluție de conjugat de anticorp-enzimă la fiecare godeu utilizând o pipetă de precizie.
9. Incubați godeurile agitând la 500–700 rpm pe un agitator orbital de microplăci, timp de o oră, la temperatura camerei (18-25°C).
10. Aspirați și spălați fiecare godeu de șase ori cu soluția de spălare utilizând o mașină de spălat automată pentru microplăci. Tamponați și uscați inversând placa pe materialul absorbant.
11. Adăugați 100 μl de soluție cromogenă TMB în fiecare godeu utilizând o pipetă de precizie.

Evitați expunerea lumina directă a soarelui.

12. Incubați godeurile agitând la 500–700 rpm pe un agitator orbital de microplăci, timp de 15 minute, la temperatura camerei (18-25°C).

OBSERVAȚIE: culoarea se poate dezvolta mai rapid sau mai lent decât timpul de incubare recomandat în funcție de temperatura localizată a camerei. Monitorizați vizual dezvoltarea culorii pentru a optimiza timpul de incubare.

13. Adăugați 100 μl de soluție de stopare în fiecare godeu utilizând o pipetă de precizie.
14. Citiți absorbanta soluției din godeuri în decurs de 30 de minute utilizând un cititor de microplăci setat la 450 nm.

OBSERVAȚIE:

1) În timpul citirii absorbantei godeului pentru microtitrare, este necesar să programați calibrator de zero ca „Blank” („Blanc”).

2) Dacă este disponibilă corecția lungimii de undă, setați instrumentul la măsurarea duală a lungimii de undă la 450 nm cu corecție a lungimii de undă în fundal setată între 600 nm și 630 nm.

REZULTATE

1. Calculați absorbanta medie pentru fiecare calibrator, control sau probă.
2. Trasați logaritmul citirilor medii de absorbantă pentru fiecare dintre calibratoare de-a lungul axei y în raport cu logaritmul concentrațiilor de inhibină A în pg/ml de-a lungul axei x, utilizând o curbă de ajustare liniară. Ca alternativă, datele pot fi reprezentate grafic liniar vs. liniar și poate fi utilizată o curbă de ajustare spline netezită.
3. Trasați cea mai bună curbă de ajustare prin media punctelor duplicate.
4. Determinați concentrațiile de inhibină A ale controalelor și probelor din curba standard prin potrivirea citirilor medii de absorbantă cu concentrațiile corespunzătoare de inhibină A.
5. Orice citire a probei mai mare decât calibrator cel mai mare trebuie diluată în mod corespunzător utilizându-se calibrator 0 de inhibină A și retestată.
6. Orice citire a probei inferioară sensibilității analitice trebuie raportată ca atare.
7. Dacă este necesar, înmulțiți valoarea cu un factor de diluare.

OBSERVAȚIE: dacă citirile de absorbantă depășesc limitările cititorului de plăci, este necesară oa doua citire la 405 nm (filtru de referință între 600 nm și 630 nm, dacă este disponibil). În acest caz, continuați cu construirea unei a doua curbe standard – ca mai sus – cu citirile de absorbantă ale tuturor calibratoare la 405 nm. Concentrația probelor „în afara scalei” la 450 nm se citește apoi din

curba standard nouă. Citirile la 405 nm nu trebuie să înlocuiască citirile „pe scală” la 450 nm.

Curba standard

Calibratoare	Conc. (pg/ml)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (Blanc)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Exemplu de curbă standard; nu utilizați pentru calcule.)

Probe

Pentru conversie din UI/ml, utilizați următoarea ecuație:

$$1 \text{ UI/ml (OMS 91/624)} = 26,7 \text{ pg/ml}$$

VALORI PRECONIZATE

Fiecare laborator trebuie să stabilească propriile intervale de referință pentru a asigura reprezentarea corespunzătoare a populațiilor specifice. Următoarele valori prezentate au fost obținute cu testul ELISA pentru inhibină A utilizându-se probe de ser de la adulți sănătoși aparent normali. Toate valorile sunt raportate în pg/ml. Pentru femei cu ciclul normal, numerele de sub fiecare fază reprezintă zilele înainte sau după creșterea bruscă a nivelului de LH.

Populație	n	Medie	Valoare medie	Interval de încredere de 95%
Femei cu ciclul normal				
Fază foliculară timpurie (de la -14 la -10)	136	13,48±0,93	10,54	+5,46-28,16
Fază foliculară de mijloc (între -9 și -4)	228	18,63±0,59	17,06	+7,87-34,54
Fază foliculară tardivă (între -3 și -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Fază de mijloc a ciclului (ziua 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Fază luteală timpurie (între și 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Fază luteală de mijloc (între 4 și 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Fază luteală tardivă (între și 14)	82	27,87±3,20	17,44	+7,28-89,95
Niveluri de vârf IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1690
PCOS – Ovulator	26	+9,32±2,61		+5,65-15,99
Post-menopauză	23	+1,15±0,24		+<1-3,88
Bărbați normali	40	+1,33±0,42		+<1-3,58

† Valorile pentru inhibină A sub Calibratorul 1 sunt extrapolate.

Valorile prezentate în tabelul următor sunt pentru inhibină A seric maternă în al doilea trimestru.

Săptămână finalizată	Nr. de probe	Inhibină A mediană (pg/ml)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabel adaptat din valori furnizate de un centru de screening din SUA (2005).

CONTROLUL CALITĂȚII

- Controalele ELISA sau alte controale disponibile în comerț pentru inhibină A trebuie să se încadreze între limitele de încredere stabilite.
- Limitele de încredere pentru controalele ELISA pentru inhibină A sunt tipărite pe supliment.
- În fiecare test trebuie inclusă o curbă standard completă, plus controale de nivel scăzut și de nivel ridicat.

- Soluția de cromogen TMB trebuie să fie de la incoloră până la culoare galbenă foarte deschisă. Dezvoltarea unei culori albastre poate indica instabilitatea sau contaminarea reactivilor.
- Materialele de control al calității simulează caracteristicile probelor de la pacienți și sunt esențiale pentru monitorizarea performanțelor sistemului în testările imuno-chimice. Includeți materialul de control al calității (QC) sau alte materiale de control al calității disponibile care acoperă cel puțin două niveluri de analit. Utilizarea mai frecventă a controalelor sau a unor controale suplimentare rămâne la discreția utilizatorului, în funcție de bunele practici de laborator sau cerințele de acreditare a laboratorului ori legislația în vigoare. Respectați instrucțiunile producătorului pentru reconstituire și depozitare. Fiecare laborator trebuie să stabilească valori medii și intervale acceptabile pentru a asigura funcționarea corespunzătoare. Rezultatele controlului calității care nu se încadrează în intervale acceptabile pot indica rezultate nevalide ale testelor.

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

(Pentru mai multe detalii, consultați fișa tehnică „ANEXĂ”)

Datele reprezentative sunt furnizate doar în scop ilustrativ. Performanța obținută în laboratoarele individuale poate varia.

Sensibilitate

Limită de detecție (LoD): 2,61 pg/ml

Specificitate

Anticorpusul utilizat în testul imunologic este foarte specific pentru inhibina A.

Precizie

Intra-testare

Probele au fost testate de 25 de ori în aceeași serie. Coeficienții de variație au fost găsiți mai mici sau egali cu 4,6% pentru probe de ser.

Inter-testare

Probele au fost analizate în duplicat în 10 serii diferite. Coeficienții de variație au fost găsiți mai mici sau egali cu 6,9% pentru probe de ser.

Acuratețe

Test de diluare

Probele cu concentrație ridicată au fost diluate serial cu calibratorul zero. Procentajele de recuperare obținute au fost între 97,8% și 117%.

Test de recuperare

Probele cu concentrație scăzută au fost îmbogățite cu cantități cunoscute de inhibină A. Procentajele de recuperare obținute au fost între 83,5% și 99,5%.

Interval de măsurare (de la limita de detecție până la calibratorul cu valoarea cea mai ridicată): între 2,61 pg/ml și aproximativ 1000 pg/ml.

LIMITĂRI

- Reactivii furnizați în acest set sunt optimizați pentru măsurarea nivelurilor de inhibină A în ser sau plasmă.
- Pentru testări care implică anticorpi, există posibilitatea interferenței anticorpilor heterofili din probă. Probele de la persoane care au fost expuse regulat la animale sau au beneficiat de imunoterapie sau de proceduri de diagnosticare care utilizează imunoglobuline sau fragmente de imunoglobuline pot produce anticorpi, de exemplu HAMA, care interferează cu testele imunologice. În plus, în probe pot fi prezenți alți anticorpi heterofili, precum anticorpi umani anti-capră.^{22,23} Astfel de anticorpi care produc interferențe pot provoca rezultate eronate. Evaluați cu grijă rezultatele pacienților pentru care prezența acestor anticorpi este suspectată.
- Dacă există dovezi de contaminare microbiană sau turbiditate excesivă într-un reactiv, aruncați fiola.
- Rezultatele testelor ELISA pentru inhibină A trebuie să fie interpretate în coroborare cu tabloul clinic al pacientului, incluzând: simptome, antecedentele medicale, datele unor testări suplimentare și orice alte informații relevante.

INHIBIN A ELISA

REF DSL-10-28100T-1, DSL-10-28100T-4

SAMO ZA PROFESIONALNU UPOTREBU, Komplet za inhibin A enzimski imunosorbent test (ELISA) obezbeđuje materijale za kvantitativno određivanje dimernog inhibina A u humanom serumu ili plazmi. Namenjen je isključivo za *in vitro* upotrebu kao pomoćno sredstvo u dijagnostikovanju i praćenju različitih hormonskih reproduktivnih poremećaja. Skrining na Daunov sindrom (trisomija 21) u 2. tromesečju korišćenjem kombinovanih biohemijskih i ultrazvučnih markera može se proceniti odgovarajućim algoritmima koji se mogu izvršavati na komercijalno dostupnom softveru za izračunavanje rizika.^{24, 25} Strogo se preporučuje upotreba odobrenog softvera (sa oznakom CE) posebno određenog za procenu rizika od trisomije 21, npr. softvera alfa.* Komplet za inhibin A je namenjen za upotrebu u kombinaciji sa hAFP + hCG + uE3.

KRATAK PREGLED

Inhibini su hormoni heterodimernih proteina koje luče granulozne ćelije jajnika kod žena i Sertolijeve ćelije testisa kod muškaraca. Oni selektivno suprimiraju lučenje folikul stimulišućeg hormona (FSH) hipofize i takođe imaju lokalno parakrino dejstvo u gonadima.^{1,2}

Potpuno obrađeni oblik molekula inhibina ima molekulsku težinu od približno 32 kD i sastoji se od dva odvojena lanca (α i β), koji su povezani disulfidnim vezama. Oblici sa većom molekulskom težinom, sa prekursorskim oblicima α -subjedinice, takođe se javljaju u folikularnoj tečnosti i serumu. Pored toga, takođe su prisutni oblici slobodne α -subjedinice, nepovezani sa β -subjedinicom, kojima nedostaje bioaktivnost inhibina.^{3,4,5,6}

Inhibin A se sastoji od α -subjedinice β_A -subjedinice. Određivanja inhibina A pokazala su se korisnim u ispitivanju ljudske reproduktivne fiziologije.^{7,8,9} Nekoliko objavljenih izveštaja ukazuje na korisnost određivanja inhibina A kao endokrino markera za praćenje funkcije jajnika.^{10,11,12,13,14,15,16,17} Do nedavno nije bilo moguće razlikovati cirkulišući funkcionalni dimerni inhibin i slobodnu α -subjedinicu u normalnom ljudskom menstrualnom ciklusu.

Ipak, upotrebom dobro okarakterisanog para antitela, utvrđeno je da se ELISA „sendvič“ testom na dva mesta može specifično određivati samo dimerni inhibin A.¹⁸

PRINCIP

Inhibin A ELISA test je enzimski pojačan dvostepeni „sendvič“ test. U testu, kalibratori, kontrole i uzorci se inkubiraju u bunarčićima za mikrotitraciju koji su obloženi anti-inhibin β_A subjedinica antitelom. Nakon inkubacije i ispiranja, u svaki bunarčić se dodaje anti-inhibin alfa subjedinica detekciono antitelo obeleženo peroksidazom rena (HRP). Nakon drugog koraka inkubacije i ispiranja, u bunarčiće se dodaje supstratni tetrametilbenzidin (TMB).

Na kraju se dodaje kiseli rastvor za zaustavljanje. Step enzimске transformacije supstrata se određuje merenjem apsorbanse na dve talasne dužine, na 450 nm i između 600 i 630 nm. Izmerena apsorbanse je direktno proporcionalna koncentraciji inhibina A u uzorcima. Komplet inhibin A kalibratori se koristi za crtanje standardne krive apsorbanse u odnosu na koncentraciju inhibina A. Koncentracije inhibina A u uzorcima se zatim mogu izračunati sa ove standardne krive.

UPOZORENJE I MERE OPREZA

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

Pridržavajte se smernica dobre laboratorijske prakse.¹⁹

Uzorci i proizvodi dobijeni iz krvi mogu se, uz minimalni rizik, rutinski obraditi korišćenjem opisanog postupka. Međutim, ovim proizvodima treba rukovati kao sa potencijalno infektivnim supstancama, u skladu sa univerzalnim merama predostrožnosti i smernicama dobre kliničke laboratorijske prakse, bez obzira na njihovo poreklo, obradu ili prethodnu sertifikaciju.²⁰ Koristite odgovarajući dezinficijens za dekontaminaciju. Ove materijale i posude u kojima se oni nalaze čuvajte i odlažite u otpad u skladu sa lokalnim propisima i smernicama.

GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Calibrators / Controls

UPOZORENJE



H317

Može da izazove alergijske reakcije na koži.

H412

Štetno za živi svet u vodi s dugotrajnim posledicama.

P273

Izbegavati ispuštanje/oslobađanje u životnu sredinu.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

P333+P313

Ako dođe do iritacije kože ili osipa: Potražiti medicinski savet/mišljenje.

P362+P364

Kontaminiranu odeću skinuti i oprati pre korišćenja. reakciona masa: 5-hloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 247-500-7] i 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 220-239-6](3:1) <0,05%

Antibody Enzyme Conjugate Concentrate

UPOZORENJE



H316

Izaziva blagu iritaciju kože.

H317

Može da izazove alergijske reakcije na koži.

H412

Štetno za živi svet u vodi s dugotrajnim posledicama.

P273

Izbegavati ispuštanje/oslobađanje u životnu sredinu.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

P332+P313

Ako dođe do iritacije kože: Potražiti medicinski savet/mišljenje.

P333+P313

Ako dođe do iritacije kože ili osipa: Potražiti medicinski savet/mišljenje.

P362+P364

Kontaminiranu odeću skinuti i oprati pre korišćenja. 3-(n-morfolino)-2-hidroksi propan sulfonska kiselina, natrijumova so 1 - 2% reakciona masa: 5-hloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 247-500-7] i 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 220-239-6](3:1) <0,05%

Sample Buffer A

OPASNOST



H316








Izaziva blagu iritaciju kože.

H318

Izaziva ozbiljno oštećenje očiju.

P280

Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.

	P305+P351+P338	DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.		P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
	P310	Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara.		P305+P351+P338	DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.
	P332+P313	Ako dođe do iritacije kože: Potražiti medicinski savet/mišljenje. Natrijum lauril sulfat 1 - < 3% Tris(hidroksimetil)-aminometan 1 - 2% Alkohol, C12-14-sekundarni, etoksilovani 3 - 5%		P310	Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara.
Sample Buffer B	OPASNOST			P333+P313	Ako dođe do iritacije kože ili osipa: Potražiti medicinski savet/mišljenje.
				P362+P364	Kontaminiranu odeću skinuti i oprati pre korišćenja. Tris(hidroksimetil)-aminometan 1 - 3% Alkohol, C12-14-sekundarni, etoksilovani 3 - 5% reakciona masa: 5-hloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 247-500-7] i 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 220-239-6](3:1) < 0,05%
					
	H314	Izaziva teške opekotine kože i oštećenje oka.			
	H317	Može da izazove alergijske reakcije na koži.	Rastvor za zaustavljanje A	OPASNOST	
	P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.			
	P303+P361+P353	AKO DOSPE NA KOŽU (ili u kosu): Isprati kožu vodom.		H314	Izaziva teške opekotine kože i oštećenje oka.
	P305+P351+P338	DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.		P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
	P310	Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara.		P301+P330+P331	AKO SE PROGUTA: isperite usta. NE izazivati povraćanje.
	P333+P313	Ako dođe do iritacije kože ili osipa: Potražiti medicinski savet/mišljenje.		P303+P361+P353	AKO DOSPE NA KOŽU (ili u kosu): Isprati kožu vodom.
	P362+P364	Kontaminiranu odeću skinuti i oprati pre korišćenja. Urea hidrogen peroksid 10 - 20% reakciona masa: 5-hloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 247-500-7] i 2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC br. 220-239-6](3:1) < 0,05%		P305+P351+P338	DODIR S OČIMA: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako postoje i ako su lako dostupna. Nastaviti sa ispiranjem.
				P310	Odmah pozovite CENTAR ZA KONTROLU TROVANJA ili lekara. Sumporna kiselina 1 - 3%
Conjugate Diluent	OPASNOST		Wash solution (20x)	OPASNOST	
					
				H360	Može da ošteti plodnost ili nerođeno dete.
	H316	Izaziva blagu iritaciju kože.		P201	Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.
	H317	Može da izazove alergijske reakcije na koži.		P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
	H318	Izaziva ozbiljno oštećenje očiju.		P308+P313	AKO ste izloženi ili zabrinuti: Potražite medicinski savet/mišljenje. Borna kiselina 0,1 - 0,3% Natrijum-borat dekahidrat 0,1 - 0,3%
	H412	Štetno za živi svet u vodi s dugotrajnim posledicama.			
	P273	Izbegavati ispuštanje/oslobađanje u životnu sredinu.			
					Dokument „Bezbednosni list“ dostupan je na internet stranici beckmancoulter.com/techdocs

PRIKUPLJANJE UZORAKA, OBRADA, SKLADIŠTENJE I RAZBLAŽIVANJE

Serum i plazma su preporučeni uzorci.

Poštujte sledeće preporuke za rukovanje, obradu i čuvanje uzoraka krvi:²¹

- Prikupite sve uzorke krvi poštujući rutinske mere predostrožnosti za venepunkciju.
- Epruvete uvek držite zatvorenim.
- U roku od dva sata nakon centrifugiranja, prebacite najmanje 500 µl uzorka koji ne sadrži ćelije u epruvetu za skladištenje. Odmah čvrsto zatvorite epruvetu za uzorak.
- Nerazblažene ili razblažene uzorke čuvajte čvrsto zatvorene na temperaturi od 2 do 8°C ne duže od 24 sata.
- Ukoliko test neće biti završen u roku od 24 sata ili u slučaju transporta uzoraka, zamrznite na -20°C ili nižoj temperaturi do 30 dana.

Prilikom pripreme uzoraka pridržavajte se sledećih smernica:

- Proverite da li su rezidualni fibrin i ćelijski materijal uklonjeni pre analize.
- Sledite preporuke proizvođača epruveta za prikupljanje uzorka krvi u vezi sa centrifugiranjem.

Svaka laboratorija treba da utvrdi kriterijume za prihvatljivost sopstvenih epruveta za prikupljanje uzoraka krvi i proizvoda za odvajanje seruma. Kod ovih proizvoda mogu postojati varijacije između proizvođača i, s vremena na vreme, od lota do lota.

Izbegavati ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka.

Izbegavajte testiranje lipemičnih, ikteričnih ili hemolizovanih uzoraka.

ISPORUČENI MATERIJALI

Komplet za određivanje inhibina A: 96 bunarčića (kat. br. DSL-10-28100T-1)

Trake za mikrotitraciju obložene anti-inhibin A antitelom: Jedan držač traka, koji sadrži 96 bunarčića za mikrotitraciju.

Bunarčići za mikrotitraciju od polistirena sa anti-inhibinom β_A imobilisanim na unutrašnjem zidu svakog bunarčića.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja navedenog na vrećici sa zatvaračem i desikantom koji štiti od vlage.

Koncentrat inhibin A antitelo-enzim konjugata: jedna bočica od 0,6 ml

Mišije monoklonsko anti-inhibin α -subjedinica antitelo-HRP konjugat, MOPSO, BSA i < 1,0% ProClin** 300.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Pre upotrebe razblažite u rastvoru konjugata.

Kalibratori: Šest bočica od 1 ml i jedna bočica od 2 ml „nultog“ kalibratora (spremno za upotrebu)

Koncentracije od približno 0, 10, 30, 100, 250, 500 i 1.000 pg/ml rekombinantnog dimernog inhibina A u govedem serumu sa < 0,5% ProClin 300.

Tačne koncentracije potražite na nalepicama bočica.

Čuvati neotvoreno na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Stabilno na temperaturi od 2 do 8°C 28 dana nakon prve upotrebe. U dužim periodima čuvati u zamrzivaču temperature -20°C (-15°C do -24°C) do datuma isteka roka trajanja.

Određivana veličina (analit) u inhibin A kalibratori je sledljiva prema Prvom međunarodnom standardu Svetske zdravstvene organizacije za inhibin-A (šifra 91/624) koji sadrži rekombinantni humani inhibin A molekulske težine 32 kDa (1 pg/ml ili 0,037 IU/ml). Dodeljene vrednosti su uspostavljene korišćenjem reprezentativnih uzoraka iz ovog lota standarda i određene su za metodologije testa reagenasa. Vrednosti koje su dodeljene na osnovu drugih metodologija mogu se razlikovati. Takve razlike, ukoliko postoje, mogu biti izazvane (bias-om) odstupanjima između metoda.

Kontrole: dve bočice od 1,0 ml (spremno za upotrebu)

Niske i visoke koncentracije rekombinantnog dimernog inhibina A u govedem serumu sa < 0,5% ProClin 300.

Očekivane vrednosti su u opsegu koncentracije navedenim na dodatku.

Čuvati neotvoreno na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Stabilno na temperaturi od 2 do 8°C 28 dana nakon prve upotrebe. U dužim periodima čuvati u zamrzivaču temperature -20°C (-15°C do -24°C) do datuma isteka roka trajanja.

Pufer za uzorak A: jedna bočica od 10,0 ml

Pufer sa albuminom govedeg seruma (BSA), životinjski serum (koze, miša), surfaktant i natrijum azid.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Pufer za uzorak B: jedna bočica od 10,0 ml

Pufer sa < 20% urea vodonik peroksida, < 0,5% ProClin 300 i natrijum azid.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Rastvor TMB hromogena: jedna bočica od 11,0 ml

Tetrametilbenzidin (TMB) u citratnom puferu sa vodonik peroksidom.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Rastvor za zaustavljanje A: jedna bočica od 11,0 ml

0,2 M sumporne kiseline.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C ili sobnoj temperaturi (18-25°C) do datuma isteka roka trajanja.

Rastvor konjugata: jedna bočica od 15,0 ml

Pufer sa BSA, životinjski serum (koziji, mišiji), surfaktant i < 1,0% ProClin 300.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja.

Rastvor za ispiranje U (20X): Jedna bočica od 50 ml

Koncentrovani rastvor mora da se razblaži pre upotrebe.

Čuvati na temperaturi od 2 do 8°C ili sobnoj temperaturi (18-25°C) do datuma isteka roka trajanja.

Komplet za određivanje inhibina A: 384 bunarčića (kat. br. DSL-10-28100T-4)

Trake za mikrotitraciju obložene anti-inhibin A antitelom: Četiri držača traka, od kojih svaki sadrži 96 bunarčića za mikrotitraciju.

Koncentrat inhibin A antitelo-enzim konjugata: četiri bočice od 0,6 ml

Kalibratori: dvanaest bočica od 1 ml i dve bočice od 2 ml „nultog“ kalibratora (spremno za upotrebu)

Kontrolni serumi: četiri bočice od 1,0 ml (spremno za upotrebu)

Pufer za uzorak A: četiri bočice od 10,0 ml

Pufer za uzorak B: tri bočice od 10,0 ml

Rastvor TMB hromogena: jedna bočica od 50,0 ml

Rastvor za zaustavljanje A: četiri bočice od 11,0 ml

Rastvor konjugata: četiri bočice od 15,0 ml

Rastvor za pranje (20x): dve bočice od 50 ml

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU OBEZBEĐENI

Pored standardne laboratorijske opreme, potrebne su sledeće stavke:

- Čitač ploče za mikrotitraciju podržava merenje apsorbance na 450 nm i preferencijalno podržava korekciju dve talasne dužine između 600 do 630 nm
- Dejonizovana voda
- Precizna pipeta za sipanje 50–100 µl
- Šejker ploče za mikrotitraciju koji podržava 500–700 okreta u minuti (rpm)
- Perač ploče za mikrotitraciju
- Vrtložna mešalica
- Apsorbentni materijali za isušivanje traka
- Milimetarski papir za ručnu redukciju podataka

POSTUPAK

Proceduralne napomene

- Detaljno razumevanje ovog uputstva u pakovanju neophodno je za uspešnu upotrebu inhibin A ELISA testa.
- Kupac ima obavezu da proveri test za upotrebu.

- Pouzdani rezultati će se dobiti samo upotrebom preciznih laboratorijskih tehnika i uz tačno praćenje uputstva u pakovanju.
- Standardna kriva mora biti obuhvaćena sa svakim testom.
- Pre upotrebe dovedite sve reagense u kompletu na sobnu temperaturu (18-25°C).
- Pre upotrebe temeljno promešajte reagense laganim obrtanjem.
- Ne mešajte različite lotove bilo koje komponente kompleta u okviru pojedinačnog testa.
- Ne koristiti ni jednu komponentu iz pakovanja nakon datuma isteka roka koji je naznačen na nalepnici.
- Nepotpuno pranje će negativno uticati na ishod i preciznost testa.
- Da bi se smanjilo potencijalno odstupanje rezultata testa usled varijacija u vremenu inkubacije supstrata, treba voditi računa da se rastvor za zaustavljanje dodaje u bunarčiće istim redosledom i brzinom koji su korišćeni za dodavanje rastvora TMB hromogena.
- Svim reagensima treba rukovati pažljivo kako bi se izbeglo uvođenje mikrobioloških kontaminanata koji mogu oštetiti reagense, a posebno rastvor konjugata i pufer za uzorak A.
- Izbegavajte kontaminaciju rastvora TMB hromogena konjugatima.
- Za svaki reagens, kalibrator, kontrolu ili uzorak koristite čisti vrh za pipetu za jednokratnu upotrebu.
- Za sipanje rastvora sumporne kiseline i TMB hromogena izbegavajte pipete sa metalnim delovima.
- Enzim koji se koristi za obeležavanje inaktivira se kiseonikom i veoma je osetljiv na mikrobiološku kontaminaciju, natrijum azid, hipohlornu kiselinu i aromatične hlorigljovodonike koji se često nalaze u zalihama vode u laboratoriji.
- Koristite dejonizovanu vodu.
- Izbegavati izlaganje reagenasa prevelikoj toploti ili direktnoj sunčevoj svetlosti tokom skladištenja i inkubacije.

Priprema reagenasa

1. **Rastvor za ispiranje:** sipajte sadržaj bočice u 950 ml destilovane vode i homogenizujte. Razblaženi rastvor se može čuvati mesec dana na temperaturi od 18 do 25°C ili na temperaturi od 2 do 8°C do datuma isteka roka trajanja kompleta.
2. **Rastvor inhibin A antitelo-enzim konjugata:** koncentrat inhibin A antitelo-enzim konjugata treba razblažiti u odnosu 1 deo u 50 delova inhibin A rastvora konjugata, u skladu sa brojem korišćenih bunarčića. Za celu ploču, pipetom sipajte tačno 220 µl koncentrata inhibin A antitelo-enzim konjugata u 11 ml rastvora konjugata.
NAPOMENA: koncentrat inhibin A antitelo-enzim konjugata treba da bude sveže razblažen 10–15 minuta pre upotrebe.
3. **Bunarčići za mikrotitraciju:** izaberite broj obloženih bunarčića koji je potreban za test. Preostale bunarčiće koji se neće koristiti treba staviti u vrećicu sa zatvaračem i desikantom. Vrećica se mora ponovo zatvoriti radi zaštite od vlage.

Postupak testa

Sačekajte da se svi uzorci i reagensi izjednače na sobnoj temperaturi (18-25°C). Pre upotrebe temeljno promešajte reagense blagim okretanjem. Nakon rekonstitucije reagenasa temeljno promešajte, izbegavajući stvaranje pene. Kalibratori, kontrole i uzorke treba testirati u duplikatu.

1. Označite trake za mikrotitraciju koje će biti korišćene.
2. Pipetom sipajte 50 µl kalibratora, kontrola i uzoraka u odgovarajuće bunarčiće.
3. Preciznom pipetom dodajte 50 µl pufera za uzorak A u svaki bunarčić.
4. Preciznom pipetom dodajte 50 µl pufera za uzorak B u svaki bunarčić.
5. Inkubirajte bunarčiće protresanjem brzinom od 500–700 obr/min na orbitalnom šejkeru mikroploče, tokom tri sata na sobnoj temperaturi (18-25°C).
6. Pripremite rastvor antitelo-enzim konjugata razblaživanjem koncentrata antitelo-enzim konjugata u inhibin A rastvoru konjugata, kao što je opisano u poglavlju „Priprema reagenasa“ ovog uputstva u pakovanju.
7. Aspirirajte i isperite svaki bunarčić šest puta rastvorom za ispiranje koristeći automatski perač mikroploče ili ručno koristeći preciznu pipetu. Upijte i osušite okretanjem ploče na apsorbenom materijalu.

NAPOMENA: strogo se preporučuje upotreba automatskog perača mikroploče. Nepotpuno pranje će negativno uticati na preciznost testa. Ako perač mikroploče nije dostupan, pratite korake u nastavku za ručno pranje mikroploče:

(a) Potpuno aspirirajte tečnost iz svakog bunarčića

(b) Preciznom pipetom sipajte 350 µl rastvora za ispiranje u svaki bunarčić

(c) Ponovo aspirirajte tečnost

(d) Ponovite korake (b) i (c) pet puta

8. Preciznom pipetom dodajte 100 µl rastvora antitelo-enzim konjugata u svaki bunarčić.
9. Inkubirajte bunarčiće protresanjem brzinom od 500–700 obr/min na orbitalnom šejkeru mikroploče, tokom jednog sata na sobnoj temperaturi (18-25°C).
10. Aspirirajte i isperite svaki bunarčić šest puta rastvorom za ispiranje koristeći automatski perač mikroploče. Osušite okretanjem ploče na apsorbenom materijalu.
11. Preciznom pipetom dodajte 100 µl rastvora TMB hromogena u svaki bunarčić.

Izbegavati izlaganje direktnoj sunčevoj svetlosti.

12. Inkubirajte bunarčiće protresanjem brzinom od 500–700 obr/min na orbitalnom šejkeru mikroploče, tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi (18-25°C).

NAPOMENA: imajte na umu da se boja može razviti brže ili sporije od preporučeneog vremena inkubacije, u zavisnosti od lokalizovane sobne temperature. Vizuelno pratite razvijanje boje radi optimizacije vremena inkubacije.

13. Preciznom pipetom dodajte 100 µl rastvora za zaustavljanje u svaki bunarčić.
14. Očitavajte apsorbansu rastvora u bunarčićima tokom 30 minuta, koristeći čitač mikroploče postavljen na 450 nm.

NAPOMENA:

1) Tokom očitavanja apsorbance bunarčića za mikrotitraciju, neophodno je programirati nulti kalibrator kao „slepu probu“.

2) Ako je dostupna korekcija talasne dužine, podesite instrument da meri dve talasne dužine pri 450 nm sa pozadinskom korekcijom talasne dužine postavljenom na vrednost između 600 i 630 nm.

REZULTATI

1. Izračunajte srednju apsorbansu za svaki kalibrator, kontrolu ili uzorak.
2. Iscrtaite dijagram logaritamskih očitanih srednjih vrednosti apsorbance za svaki kalibrator na y-osi u odnosu na logaritamske vrednosti koncentracija inhibina A u pg/ml na x-osi, korišćenjem prilagođavanja krivoj linearne regresije. Alternativno, podaci se mogu iscrtati na dijagramu sa linearnim osama i može se koristiti prilagođavanje krivoj uglačanog splajna.
3. Nacrtajte najprilagođeniju krivu kroz srednje vrednosti tačaka duplikata.
4. Odredite koncentracije inhibina A u kontrolama i uzorcima sa standardne krive uparivanjem očitanih srednjih vrednosti apsorbance sa odgovarajućim koncentracijama inhibina A.
5. Bila koju očitano vrednost uzorka koja je viša od najvišeg kalibratora treba prikladno razblažiti korišćenjem inhibin A kalibratora 0 i ponovo testirati.
6. Bila koju očitano vrednost uzorka koja je niža od analitičke osetljivosti treba izdati kao takvu.
7. Po potrebi pomnožite vrednošću faktora dilucije.

NAPOMENA: ako su očitane vrednosti apsorbance veće od ograničenja čitača ploče, neophodno je drugo očitavanje pri 405 nm (referentni filter između 600 i 630 nm, ukoliko postoji). U tom slučaju, nastavite sa izradom druge standardne krive kao što je gore opisano sa očitanim vrednostima apsorbance svih kalibratora pri 405 nm. Koncentracija nepouzdanih uzoraka

pri 450 nm se zatim očitava sa nove standardne krive. Očitane vrednosti pri 405 nm ne treba da zamene očitane pouzdane vrednosti pri 450 nm.

Standardna kriva

Kalibratori	Konc. (pg/ml)	A	B/B _{max} (%)
0	0,00	0,022 (slepa proba)	-
1	9,20	0,028	1,021
2	24,3	0,082	2,991
3	90,0	0,305	11,11
4	214	0,733	26,75
5	415	1,302	47,48
6	833	2,741	100,0

(Primer standardne krive, ne koristiti za proračun)

Uzorci

Da biste izvršili pretvaranje iz jedinice IU/ml, koristite sledeću jednačinu:

$$1 \text{ IU/ml (WHO (SZO) 91/624)} = 26,7 \text{ pg/ml}$$

OČEKIVANE VREDNOSTI

Svaka laboratorija treba da uspostavi sopstvene referentne opsege kako bi se obezbedilo pravilno predstavljanje određenih populacija. Sledeće prikazane vrednosti su dobijene inhibin A ELISA testom uz korišćenje uzoraka seruma naizgled normalnih zdravih odraslih osoba. Sve vrednosti su izdate u pg/ml. Kod žena sa normalnim ciklusom, brojevi navedeni ispod svake faze predstavljaju dane pre ili posle skoka LH.

Populacija	n	Srednja vrednost	Srednji	95% opseg pouzdanosti
Žene sa normalnim ciklusom				
Rana folikularna faza (-14 do -10)	136	13,48±0,93	10,54	†5,46-28,16
Srednja folikularna faza (-9 do -4)	228	18,63±0,59	17,06	†7,87-34,54
Kasna folikularna faza (-3 do -1)	130	56,10±2,30	52,19	19,49-102,3
Sredina ciklusa (dan 0)	42	98,87±30,99	98,23	49,92-155,5
Rana lutealna faza (1 do 3)	115	71,59±3,39	67,24	35,93-132,7
Srednja lutealna faza (4 do 11)	268	75,22±2,63	72,51	13,15-159,6
Kasna lutealna faza (12 do 14)	82	27,87±3,20	17,44	†7,28-89,95
Vršni nivoi IVF	43	792,4±70,63	705,91	354,2-1.690
Sindrom policističnih jajnika (PCOS) - ovulatorni	26	†9,32±2,61		†5,65-15,99
Postmenoazua	23	†1,15±0,24		†<1-3,88
Normalni muškarci	40	†1,33±0,42		†<1-3,58

† Vrednosti inhibina A manje od kalibratora 1 su ekstrapolirane.

Vrednosti u sledećoj tabeli predstavljaju inhibin A seruma majke u drugom tromesečju.

Završena nedelja	Br. uzoraka	Medijana za inhibin A (pg/ml)	LOG ₁₀ SD
15	30	157,55	0,27
16	124	153,29	0,27
17	74	151,20	0,27
18	45	155,14	0,27
19	20	165,18	0,27
20	16	185,76	0,27

Tabela prilagođena na osnovu vrednosti dobijenih od američkog centra za skrining (2005).

KONTROLA KVALITETA

- Inhibin A ELISA kontrole ili druge komercijalne kontrole treba da se nalaze unutar uspostavljenih limita pouzdanosti.
- Limiti pouzdanosti za inhibin A ELISA kontrole odštampani su navedenim na dodatku.
- Potpunu standardnu krivu, kao i kontrole niskog i visokog nivoa, treba uključiti u svaki test.

- Rastvor TMB hromogena treba da bude bezbojan do veoma svetlo žut. Razvijanje plave boje može ukazivati na kontaminaciju ili nestabilnost reagensa.
- Materijali za kontrolu kvaliteta simuliraju karakteristike uzoraka pacijenta i od suštinskog su značaja za praćenje rada sistema kod imunohemijskih testova. Uključite kontrolu kvaliteta (QC) ili druge komercijalno dostupne materijale za kontrolu kvaliteta koji se koriste za najmanje dva nivoa analita. Češća upotreba kontrola ili upotreba dodatnih kontrola je diskreciono pravo korisnika, na osnovu smernica dobre laboratorijske prakse ili zahteva za akreditaciju laboratorije i važećih zakona. Pratite uputstva proizvođača u vezi rekonstitucije i skladištenja. Svaka laboratorija treba da utvrdi srednje vrednosti i prihvatljive opsege kako bi se obezbedio pravilan rad. Rezultati kontrole kvaliteta koji se ne nalaze unutar prihvatljivih opsega mogu ukazivati na netačne rezultate testa.

KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

(za više detalja, videti "DODATAK")

Reprezentativni podaci su obezbeđeni u svrhu ilustracije. Performanse dobijene u pojedinačnim laboratorijama mogu da variraju.

Osetljivost

Limit detekcije (LoD): 2,61 pg/ml

Specifičnost

Antitelo koje se koristi u imunotestu je veoma specifično za inhibin A.

Preciznost

Unutar serije

Uzorci su testirani 25 puta u istoj seriji. Koeficijent varijacije je ispod ili jednak 4,6% za uzorke seruma.

Između serija

Uzorci seruma su testirani u duplikatu u 10 različitih serija. Ustanovljeni su koeficijenti varijacije manji ili jednaki 6,9% za uzorke seruma.

Tačnost

Test razblaživanja

Visoko koncentrovani uzorci seruma su serijski razblaživani nultim kalibratorom. Dobijeni procenti recovery vrednosti bili su između 97,8% i 117%.

Recovery test

U uzorke niske koncentracije dodate su poznate količine inhibina A. Dobijeni procenat recovery vrednosti iznosio je između 83,5% i 99,5%.

Merni opseg (od limita detekcije do najvišeg kalibratora): od 2,61 do otprilike 1.000 pg/ml.

OGRANIČENJA

- Reagensi koji se isporučuju u ovom kompletu su optimizovani za određivanje nivoa inhibina A u serumu ili plazmi.
- Za testove u kojima se koriste antitela postoji mogućnost interferencije heterofilnih antitela u uzorku. Uzorci osoba koje su redovno bile u kontaktu sa životinjama ili koje su primile imunoterapiju ili bile podvrgnute dijagnostičkim postupcima u kojima se koriste imunoglobulini ili fragmenti imunoglobulina, mogu stvoriti antitela, npr. HAMA, koja interferiraju sa imunotestovima. Pored toga, druga heterofilna antitela, kao što su humana anti-kozija antitela, mogu biti prisutna u uzorcima.^{22,23} Takva interferirajuća antitela mogu uzrokovati pogrešne rezultate. Pažljivo procenite rezultate pacijenata za koje se sumnja da imaju ova antitela.
- Ako postoje dokazi o mikrobiološkoj kontaminaciji ili preteranoj zamućenosti reagensa, bacite bočicu u otpad.
- Rezultate inhibin A ELISA testa treba tumačiti u svetlu celokupne kliničke slike pacijenta, uključujući: simptome, kliničku istoriju, podatke iz dodatnih testova i druge prikladne informacije.

APPENDIX

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Summary and explanation of the test

Sensitivity

Limit of Detection (LoD): 2.61 pg/mL

Specificity

The Inhibin A ELISA assay is highly specific for inhibin A. The following substances did not exhibit cross-reactivity in the Inhibin A ELISA.

HORMONE	CONCENTRATION TESTED
Inhibin B	1 µg/mL
Activin-A	1 µg/mL
Activin-B	1 µg/mL
Pro-Alpha C	0.27 µg/mL

Interference

The following substances in the amounts listed did not significantly interfere with the measurement of inhibin A in the Inhibin A ELISA.

Substance	Concentration Tested	Substance	Concentration Tested
Bilirubin (conjugated)	5 mg/dL	Aminophylline	100 µg/mL
Triglycerides	500 mg/dL	Acetaminophen	100 µg/mL
Hemoglobin	100 mg/dL	Caffeine	100 µg/mL
Follistatin	1 µg/mL	Ibuprofen	100 µg/mL
Alpha 2 Macroglobulin	10 µg/mL	Indomethacin	100 µg/mL
HSA	6 g/dL	Acetylsalicylic Acid	100 µg/mL
Catalase	1 units/mL	Ascorbic Acid	100 µg/mL

Precision

Intra-assay

Serum samples	S1	S2	S3
Number of determinations	25	25	25
Mean value (pg/mL)	47.26	206.4	741.2
C.V., %	4.41	3.20	4.58

EDTA plasma samples	P1	P2	P3
Number of determinations	25	25	25
Mean value (pg/mL)	32.56	305.73	710.76
C.V., %	4.37	4.11	5.24

Inter-assay

Serum samples	S1	S2	S3
Number of determinations	10	10	10
Mean value (pg/mL)	37.36	282.0	374.9
C.V. (%)	6.86	4.87	3.18

EDTA plasma samples	P1	P2	P3
Number of determinations	10	10	10
Mean value (pg/mL)	26.13	77.44	575.38
C.V., %	5.11	7.86	3.59

Accuracy

Dilution test

Three serum and EDTA plasma samples were diluted with 0 pg/mL Inhibin A calibrator and assayed.

Serum samples	Dilution factor	Inhibin A (pg/mL)		Ratio (%) Measured/Expected
		Measured	Expected	
S1	-	720.1	-	-
	1:2	367.6	360.3	102.0
	1:4	201.7	180.1	112.0
	1:8	100.7	90.07	111.9
S2	1:16	47.12	45.04	104.6
	-	847.2	-	-
	1:2	414.1	423.6	97.76
	1:4	230.3	211.8	108.8
S3	1:8	112.2	105.9	106.0
	1:16	57.06	52.95	107.8
	-	644.6	-	-
	1:2	348.4	322.3	108.1
S3	1:4	188.1	161.2	116.7
	1:8	87.05	80.58	108.0
	1:16	42.13	40.29	104.6

EDTA plasma samples	Dilution factor	Inhibin A (pg/mL)		Ratio (%) Measured/Expected
		Measured	Expected	
P1	-	704.0	-	-
	1:2	362.4	352.0	103.0
	1:4	187.5	176.0	106.5
	1:8	93.89	88.00	106.7
P2	1:16	45.20	44.00	102.7
	-	678.6	-	-
	1:2	304.2	339.3	89.66
	1:4	154.6	169.6	91.11
P3	1:8	76.73	84.82	90.46
	1:16	35.21	42.41	83.00
	-	484.8	-	-
	1:2	239.5	242.4	98.79
P3	1:4	107.3	121.2	88.54
	1:8	53.30	60.60	87.96
	1:16	25.09	30.30	82.81

Recovery test

Known amount of Inhibin A was added to 5 serum or plasma samples and assayed according to the procedure of the kit.

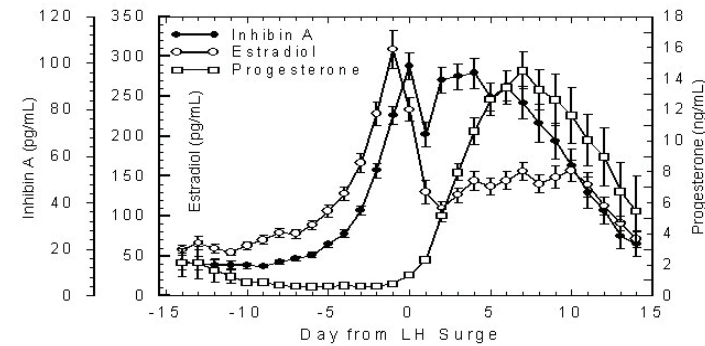
Serum samples	Endog. conc. (pg/mL)	Added conc. (pg/mL)	Expected conc. (pg/mL)	Measured conc. (pg/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
S1	14.77	6.18	20.96	20.86	99.54
	14.03	17.51	31.54	28.54	90.50
	14.64	36.29	50.92	46.44	91.19
S2	29.84	9.74	39.57	38.52	97.34
	30.24	29.62	59.86	55.34	92.44
	29.39	57.57	86.95	81.24	93.43
S3	32.01	12.97	44.98	42.20	93.82
	32.59	39.59	72.18	66.45	92.07
	31.37	76.20	107.57	94.09	87.47
S4	41.45	16.81	58.26	55.13	94.63
	42.43	51.65	94.08	87.66	93.18
	40.64	92.45	133.09	116.59	87.60
S5	15.48	5.96	21.44	17.90	83.48
	14.71	17.11	31.82	27.70	87.04
	15.33	35.81	51.14	43.18	84.43

EDTA plasma	Endog. conc. (pg/mL)	Added conc. (pg/mL)	Expected conc. (pg/mL)	Measured conc. (pg/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
P1	579.6	9.42	589.0	553.2	93.92
	587.2	28.66	615.9	590.0	95.80
	571.1	55.75	626.9	618.6	98.69
P2	25.31	8.03	33.34	35.34	106.0
	25.59	24.32	49.91	50.38	100.9
	25.00	47.51	72.50	72.49	99.99
P3	60.37	17.01	77.38	75.24	97.23
	61.83	52.10	113.9	111.6	97.94
	59.25	92.45	151.7	146.5	96.57
P4	48.29	16.81	65.10	71.01	109.1
	49.44	51.65	101.1	92.69	91.70
	47.35	92.45	139.8	135.6	96.97
P5	351.8	5.96	357.8	320.6	89.61
	334.4	75.33	409.7	383.8	93.67
	348.4	35.81	384.2	427.3	111.2

Expected values

Figure 1: Physiological Profiles of Inhibin A, Estradiol and Progesterone During the Normal Ovulatory Cycle

The mean ± SE concentrations of inhibin A, estradiol, and progesterone in 35 subjects (9 subjects with two cycles each, total 44 normal cycles) are shown, aligned relative to the day of the mid cycle LH peak. The inhibin A levels remained low (13.6 pg/mL) during the early follicular phase and rose in the late follicular phase to reach a peak concentration (98.9 pg/mL) on the day of the LH peak. After the LH peak, inhibin A levels fell briefly, then rose again during early to mid luteal phase, and fell again in concert with the drop in progesterone during the late luteal phase (28.3 pg/mL). Estradiol and inhibin A were highly correlated during the follicular phase (day -14 to -2) as evident by the following linear regression data:

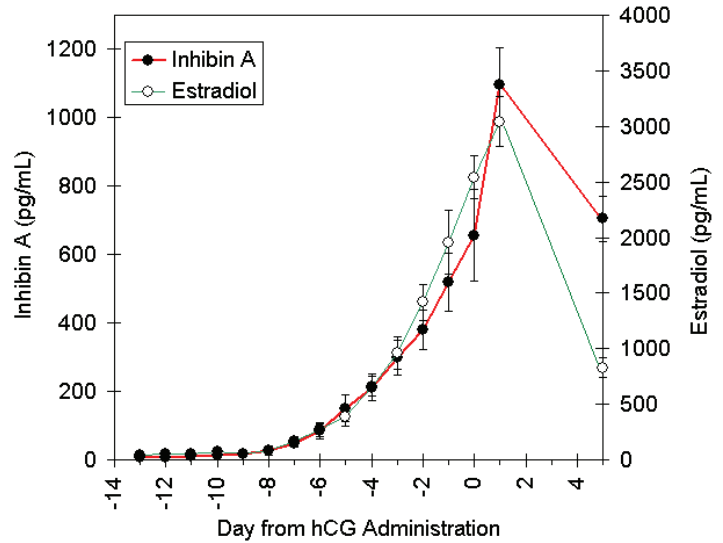


Inhibin A = 0.18 [Estradiol] + 3.3	Inhibin A range†: 3.0 - 82.8 pg/mL
n = 433	Estradiol range: 5.0 - 359 pg/mL
r = 0.80	95% Confidence interval for slope = 0.17 - 0.19
p < 0.001	95% Confidence interval for intercept = 1.8 - 4.8

†Inhibin A values below Calibrator 1 are extrapolated.

Figure 2: Inhibin A and Estradiol Profiles in Ovulation Induction Cycles

The mean ± SE concentrations of inhibin A and estradiol in 20 subjects during ovarian stimulation for IVF are shown, aligned to the day of hCG treatment.



Serum and Plasma Comparisons

Figures 3 and 4 compare inhibin A levels in paired serum vs. EDTA plasma and serum vs. Heparin plasma samples, respectively.

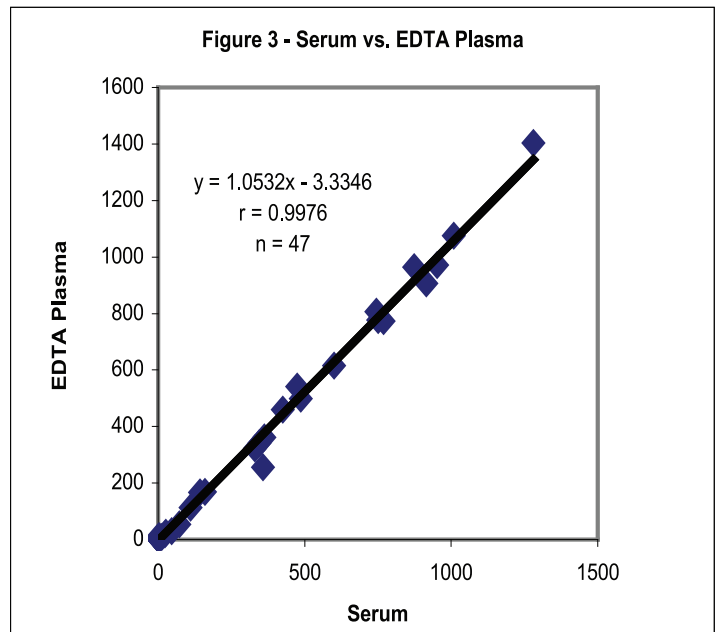
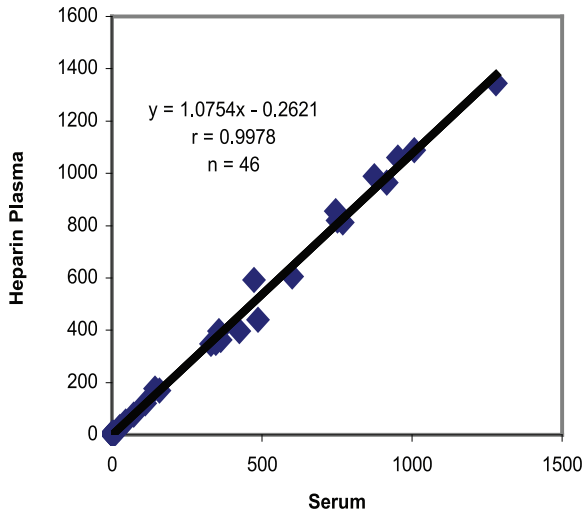


Figure 4 - Serum vs. Heparin Plasma



Comparison of Inhibin A and Estradiol

Two hundred forty-six samples were collected from subjects scheduled for IVF at two different centers. Inhibin A was measured by ELISA and estradiol was measured by two separate commercially available kits. Regression analysis yielded the following:

Inhibin A = 0.247 [Estradiol] + 67.6	Inhibin A range† = 2.2 - 1,395 pg/mL
n = 246	Estradiol range = 10 - 5,960 pg/mL
r = 0.85	95% Confidence interval for slope = 0.227 - 0.267
p < 0.0001	95% Confidence interval for intercept = 44.1 - 91.2

† Inhibin A values below Calibrator 1 are extrapolated.

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

*alpha is a trademark of Logical Medical Systems Ltd.


**ProClin™ is a trademark of The Dow Chemical Company ("Dow") or an affiliated company of Dow.


Symbols Key

REF Product Reference / Référence du produit / Produktreferenz / Riferimento prodotto / Número de referencia del producto / Referência do produto / Produktreferens / Κωδικός αναφοράς προϊόντος / 产品参考 / Gaminio nuoroda / Termékszám / Dane referencyjne produktu / Reference k produktu / Referenčné označenie výrobku / 제품 참조 자료 / Úrűn Referans / Ссылка на продукт / Референция за продукт / 產品參考

IVD In Vitro Diagnostic / Diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostica in vitro / Para diagnóstico in vitro / Diagnóstico in vitro / InVitro-diagnostik / Για διάγνωση in vitro / 体外诊断 / In vitro diagnostika / In vitro diagnostikai felhasználásra / Diagnostyka in vitro / Diagnostika in vitro / 체외 진단 / In Vitro Diagnostik / Diagnostika in vitro / За ин витро диагностика / 體外診斷


CONTENTS Contents / Contenu / Inhalt / Contenuto / Contenido / Conteúdo / Περιεχόμενο / 組成 / Rinkinio sudėtis / Tartalom / Zawartość / Obsah / Obsah / 내용물 / İçindekiler / Содержание / Съдържание / 目錄


 Manufactured by / Fabriqué par / Hergestellt von / Prodotto da / Fabricado por / Tillverkas av / Κατασκευαστής / 製造商 / Gamintojas / Gyártó: / Producent / Výrobce / Výrobca / 제조 / Üretici / Изготовлено / Произведено от / 製造商


 Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para <n> ensayos / Conteúdo suficiente para "n" ensaios / Räckert till "n" antal tester / Περιεχόμενο επαρκές για "n" εξετάσεις / 含量足够 <n> 次测试 / Turinio pakanka <n> tyrim / <n> teszthez elegendő mennyiséget tartalmaz / Zawartość wystarcza na <n> testów / Lze použít pro <n> testů / Obsah vystačí na <n> testov / <n> 테스트에 대해 충분한 양 포함 / <n> sayida test için yeterlidir / Содержит достаточно для количества тестов: <n> / Съдържа достатъчно за <n> теста / 內容物足夠執行 <n> 次測試

CE CE Mark / Marquage CE / CE-Kennzeichnung / Marchio CE / Mercado CE / Marcação CE / CE-märkning / Σήμανση CE / CE 标志 / CE ženklas / CE jelzés / Znak CE / Značka CE / Označenie CE / CE 표시 / CE İşareti / Маркировка CE / CE маркировка / CE 標識

SDS Safety Data Sheet / Fiche technique santé-sécurité / Sicherheitsdatenblatt / Scheda dati di sicurezza / Hoja de datos de seguridad / Ficha de Dados de Segurança / Säkerhetsdatablad / Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας / 安全数据单 / Saugos duomenų lapas / Biztonsági adatlap / Karta Charakterystyki Bezpieczeństwa / Bezpečnostní list / Bezpečnostný list / 안전보건자료 / Güvenlik Bilgi Formu / Паспорт безопасности / Информационен Лист За Безопасност / 安全性資料表

 Consult Instructions for Use / Consultez le mode d'emploi / Siehe Gebrauchsanweisung / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Konsultera bruksanvisning / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / 請參閱使用說明 / Skaitykite naudojimo instrukciją / Olvassa el a használati utasítást / Zapoznać się z instrukcją użycia / Postupujte podle návodu k použití / Prečítajte si návod na použitie / 사용 안내 문의 / Kullanma Talimatına Başvurun / Обратитесь к инструкциям / Вижте Инструкциите за употреба / 請參閱使用說明

 Temperature range(s) / Plage(s) de température / Temperaturbereich(e) / Intervallo(i) di temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Temperaturintervall / Εύρος(-η) θερμοκρασίας / 溫度範圍 / Temperaturüros diapazonas (-ai) / Hőmérséklet-tartomány(ok) / Zakres(y) temperatury / Rozsahy teplot / Rozsah(y) teploty / 온도 범위 / Szaklık aralliklat / Диапазон(-ы) температуры / Температурен(ни) диапазон(и) / 溫度範圍

 Caution / Précaution / Achtung / Attenzione / Precaución / Atenção / Försiktighet / Προσοχή / 注意事项 / Įspėjimas / Figyelem / Uwaga / Upozornění / Upozornenie / 주의 / Dikkat / Внимание / 注意

 Expiration Date / Date D'expiration / Verfallsdatum, Verw. bis: / Data Di Scadenza / Fecha De Caducidad / Data de validade / Utgångsdatum / Ημερομηνία λήξης / 失效日期 / Galiojimo data / Lejárati idő / Data ważności / Datum expirace / Datum expirácie / 만료 날짜 / Son Kulanma Tarihi / Срок годности / Срок на годност / 到期日

LOT Lot Number / Numéro de lot / Chargennummer / Numero di lotto / Lote número / Número de lote / Satsnummer / Αριθ. παρτίδας / 批次号 / partijos numeris / Tételszám / Numer seri / Číslo sarže / 로트 번호 / Lot Numarasi / Номер партии / Номер на партида / 批號

 Date of Manufacture / Date de Fabrication / Herstellungsdatum / Data di Fabbricazione / Fecha de Fabricación / Data de Fabrico / Produktionsdatum / Ημερομηνία Παραγωγής / 生产日期 / Pagaminimo Data / Gyártás Dátuma / Data Produkcji / Datum Výroby / Datum Výroby / 제조 일자 / Üretim Tarihi / Дата Производства / Дата на Производство / 製造日期



Biohazard / Risque biologique / Rischio biologico / Riesgo biológico / Risco biológico / Biologisk fare/ Βιολογικός κίνδυνος / Veszélyes biológiai anyag / Biologické riziko/ Βιολογική τεχληία / Биологическая опасность / Pericol biologic/ biološki rizik

CONJ CONC Conjugate Concentrate/ Conjugué concentré/ Concentrato di coniugato/ Concentrado de conjugado/ Concentrado de conjugado/ Konjugatkoncentration/ Συμπύκνωμα συζε ύματος/ Konjugátum koncentrátum/ Koncentrát konjugátu / Konjugat Konsantre/ Концентрат на конюгат/ Conjugat concentrat/ Koncentrat konjugata

CONJ DIL Conjugate Diluent/ Diluant pour le conjugué/ Diluente del coniugato/ Diluyente de conjugado/ Diluente de conjugado / Konjugatfortynder/ Αραιωτικό συζευγματος/ Konjugátum-oldószér/ Diluent pro konjugát/ Konjugat Dilüent/ Разбавитель для конъюгата/ Solvent conjugat/ Razredivač konjugata

CAL 0 Calibrator/ Calibrateur/ Calibratore/ Calibrador/ Calibrador / Kalibrator/ Βαθμονομητής/ Kalibrátor/ Kalibrátor/ Kalibratör / Калибратор/ Calibrator/ Kalibrator

CAL

CTRL Control/ Contrôle/ Controllo/ Control/ Control/ Kontrol / Δεδομένα/ Kontroll/ Kontrolni vzorek/ Kontrol/ Контроль / Ser de control/ Kontrola

SOLN STOP Stopping Solution/ Solution d'arrêt/ Soluzione di arresto/ Solución de Detención/ Solução de parada/ Stopopløsning / Διάλυμα αναστολής/ Leállító oldat/ Stop roztok/ Durdurma Çözeltisi/ Завершающий раствор/ Soluție de oprire/ Rastvor za zaustavljanje

SOLN TMB TMB Chromogen Solution/ Solution chromogène TMB/ Soluzione cromogena TMB/ Solución de cromógeno TMB/ Solução de cromogénio TMB/ TMB-kromogenopløsning/ Διάλυμα χρωμογόνου TMB/ TMB kromogén oldat/ Roztok chromogenu TMB / TMB Kromojen Çözeltisi/ Раствор хромогена TMB/ Soluție cromogenă TMB/ Rastvor TMB hromogena

SOLN WASH 20x Wash Solution/ Solution de lavage/ Soluzione di lavaggio / Rastvor za pranje/ Solução de lavagem/ Skyløpløsning / Διάλυμα Πλύσης/ Mosooldat/ Promyvaci roztok/ Yıkama Çözeltisi/ Промывочный раствор/ Soluție de spălare/ Rastvor za pranje

SAMPLE BUF A Sample Buffer/ Tampon pour échantillon/ Tampone per campione/ Tampón de muestra/ Tampão de amostra/ Prøvebuffer/ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων/ Minta puffer/ Vzorkový pufr/ Numune Tamponu/ Буфер для проб/ Eşantion soluție tampon/ Uzorak pufera

SAMPLE BUF B

PLATE Plate/ Plaque/ Piastra/ Placa/ Placa/ Plade/ Πλάκα/ Lemez / Deska/ Plaka/ Планшет/ Placă/ Pločica

IFU Instruction For Use/ Mode d'emploi/ Istruzioni per l'uso / Instrucciones de uso/ Instruções de utilização/ Bruksanvisning / Οδηγίες χρήσης/ Használati utasítás/ Návod k použití / Kullanma Talimatı/ Инструкции по применению / Instrucțiuni de utilizare/ Uputstvo za upotrebu

REFERENCES

1. Vale WW, Hseuh A, Rivier C, Yu J. 1990. The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: Sporn MA and Robert AB, eds. Peptide growth factors and their receptors: handbook of experimental physiology. Vol 95. Berlin: Springer-Verlag; 211-248.
2. Burger HG. 1992. Inhibin. *Reprod Med Rev.* 1:1-20.
3. Knight PG, Beard AJ, Wrathall HM, Castillo RJ. 1989. Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin α -subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *J Mol Endocrinol* 2:189-200.
4. Schneyer AL, Sluss PM, Whitcomb RW, Martin KA, Sprengel R, Crowley WF Jr. 1991. Precursors of α inhibin modulate FSH receptor binding and biological activity. *Endocrinology* 129:1987-1999.
5. Robertson DM, Sullivan J, Watson M, Cahir N. 1995. Inhibin forms in human plasma. *J Endocrinol* 144:261-269.
6. Robertson D, Burger HG, Sullivan J, Cahir N, Groome N, Poncelet E, Franchimont P, Woodruff T, Mather JP. 1996. Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. *J Clin Endocrinol & Metab.* 81:669-676.
7. Lockwood GM, Muttukrishna S, Ledger WL. 1998. Inhibins and activins in human ovulation, conception and pregnancy. *Human Reproduction Update* 4:284-295.
8. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT, and McNeilly AS. 1994. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol* 40:717- 723.
9. Lambert-Messerlian, G, Hall JE, Sluss PM, Taylor AE, Martin KA, Groome NP, Crowley WF Jr, Schneyer A. 1994. Relatively low levels of dimeric inhibin circulate in men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 79:45-50.
10. Muttukrishna S., Fowler PA, Groome NP, Mitchell GC, Robertson WR and Knight PG. 1994. Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod* 9:1634-1642.
11. Lockwood GM, Muttukrishna S, Groome NP, Knight PG, Ledger L. 1996. Circulating inhibins and activin-A during GnRH down-regulation and ovarian hyperstimulation with recombinant FSH for in-vitro fertilization embryo transfer. *Clinical Endocrinol* 45:741-748.
12. Lindheim SR, Chang PL, Vidali A, Ferin M, Sauer MV. 1998. The utility of progesterone and inhibin A for monitoring natural-cycle IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 15:538-541.
13. Rombauts L, Verhoeven G, Meuleman C, Koninckx PR, Poncelet E, Franchimont P. 1996. Dimeric inhibin A and alpha-subunit immunoreactive material in maternal serum during spontaneous and in vitro fertilization pregnancies. *J Clin Endocrinol Metabol* 81:985-989.
14. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. 1999. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 14:409-415.
15. Ehret W, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B, et al. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. *WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:22,46pp.*
16. Crofton PM, Illingworth PJ, Groome NP, Stirling HF, Swanston I, Gow S, Wu FCW, McNeilly A, Kelnar CJH. 1997. Changes in dimeric inhibin A during normal early puberty in boys and girls. *Clin Endocrin* 46:109-114.
17. Lockwood GM, Ledger WL, Barlow DH, Groome NP, Muttukrishna S. 1997. Measurement of inhibin and activin in early human pregnancy: demonstration of fetoplacental origin and role in prediction of early pregnancy outcome. *Biol Reprod* 57:1490-1494.
18. Groome NP, O'Brien M. 1993. Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach. *J Immunol Methods* 165:167-176.
19. Clinical Laboratory Safety; Approved Guideline Second Edition, GP17-A2. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
20. HHS Publication, 5th ed., December 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Available <http://.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15>
21. Approved Guideline – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
22. Kricka, L. 2000. Interferences in immunoassays - still a threat. *Clin Chem* 46:1037.
23. Bjerner J, Nustad K, Norum LF, Olsen KH, Børner OP. 2002. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem* 48:613-621.
24. Maymon R and Shulman A. 2004. Integrated first- and second-trimester Down syndrome screening test among unaffected IVF pregnancies. *Prenat. Diagn.* 24: 125-129.
25. Wald NJ, Bestwick JP, Morris JK. 2006. Cross-trimester marker ratios in prenatal screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 26: 514-523.