

Bovine AMH ELISA

AL-114: 96 testes

Revisão: No: 01

10/12/2012

FINALIDADE DO ENSAIO

O kit (ELISA) ensaio imunoabsorvente enzimático para hormônio Anti-Mülleriano Bovino fornece materiais para a dosagem quantitativa de AMH em soro bovino e outros fluidos biológicos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O Hormônio Anti-Mülleriano é uma glicoproteína de 140 kDa produzida durante a embriogênese normal pelas células de Sertoli Células de Sertoli do testículo embrionário, causa a involução do ducto Mülleriano e inibe a gonadogênese feminina através da indução de apoptose de células alvo gonadais. Pertence a super-família de fator de crescimento transformante- β . AMH causa apoptose de células receptoras específicas de Substância Inibidora Mülleriana (MIS), enquanto não existe efeito alguma em células sem receptores. O AMH é também expressado em células granulosas e pequenos folículos antrais nos ovários, inibe o recrutamento de folículos primordiais no pool de folículos em crescimento e diminui a resposta de folículos em crescimento sob ação do FSH.

PRINCÍPIO DO TESTE

O AMH Bovino ELISA é um imunoenensaio sanduíche quantitativo em três etapas. Na primeira etapa os Calibradores diluídos serialmente e amostras desconhecidas são adicionados e incubados aos poços da microplaca revestida de anticorpos AMH.

Após a primeira incubação e lavagem, os poços são incubados com a solução biotinilada de anticorpos AMH. Após a segunda incubação e lavagem, os poços são incubados com a solução de conjugado estreptavidina peroxidase de rábano (SHRP). Após a terceira etapa de incubação e lavagem, os poços são incubados com o substrato (TMB) e em seguida é adicionada a solução ácida de parada. Em princípio, o conjugado anticorpo-biotina liga-se ao complexo antígeno-anticorpo na fase sólida, o qual por sua vez liga-se ao conjugado enzima-estreptavidina. O complexo anticorpo-antígeno-biotina conjugado-SHRP ligado aos poços é detectado por reação enzima-substrato. O grau de reposição enzimática é determinado por medida de absorbância em duplo comprimento com um filtro primário a 450 nm e um filtro de referência a 630 nm. A absorbância medida é diretamente proporcional à concentração de AMH nas amostras e calibradores.

MATERIAIS FORNECIDOS

CAL-105A AMH/MIS Calibradores A / Diluente de Amostra

Um frasco, 11 mL, identificado como AMH/MIS Cal A/Sample Diluent, contendo 0 ng/mL de AMH em tampão a base de proteína e Pro-Clean 400. Armazenar fechado de 2-8°C até a data de validade.

CAL-114 H Calibrador H AMH Bovino (Liofilizado)

Reconstituir o Calibrador H AMH Bovino com 2 mL de água deionizada. Dissolver, homogeneizar e utilizar após a reconstituição. A concentração do Calibrador H na solução estoque é de aproximadamente 10 ng/mL. Consulte a etiqueta do frasco para concentração exata. Armazenar fechado de 2-8°C até a data de validade.

PLT-114 AMH Tiras de Microtitulação Revestidas

Um suporte de tiras, contendo 12 tiras e 96 poços de Microtitulação com anticorpo AMH imobilizado na parede interna de cada poço. Armazenar de 2-8°C até a data de validade, na embalagem original com o dessecante para proteger da umidade.

ASB-113 Tampão de Ensaio AMH

Um frasco, 8 mL, contendo tampão (BSA) a base de proteína com conservante sem mercúrio. Armazenar de 2-8°C até a data de validade.

BCR-114 AMH Conjugado Biotina Pronto Para Uso

Um frasco, 12 mL, contendo anticorpo anti-AMH biotinilado em tampão a base de proteína com conservante sem mercúrio. Armazenar de 2-8°C até a data de validade.

SAR-114 AMH Conjugado Enzima-Estreptavidina Pronto Para Uso

Um frasco âmbar, 12 mL, contendo tampão a base de proteína estreptavidina-HRP (peroxidase de rábano) e conservante sem mercúrio. Armazenar de 2-8°C até a data de validade.

TMB-100 TMB Solução Cromógena

Um frasco, 11 mL, contendo Solução de tetrametilbenzidina (TMB) em tampão com peróxido de hidrogênio. Armazenar de 2-8°C até a data de validade.

STP-100 Solução de Parada

Um frasco, 11 mL, contendo ácido sulfúrico 0.2 M. Armazenar de 2°C a 30°C até a data de validade.

WSH-100 Solução de Lavagem Concentrada A

Um frasco, 60 mL, contendo salina tamponada com detergente não iônico. Armazenar de 2°C a 30°C até a data de validade. Diluir 25 vezes com água deionizada antes do uso.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

1. Leitora de microplaca com capacidade de medição de absorbância a 450 nm, 405nm e 630 nm.
2. Agitador de placas.
3. Lavadora de microplaca.
4. Pipeta de precisão semi-automática/manual para dispensar de 10–250 μ L.
5. Homogeneizador Vortex
6. Água deionizada.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Somente para uso em pesquisa in-vitro.

As seguintes precauções devem ser observadas:

- a) Siga as boas praticas de laboratório.
- b) Utilize equipamento de proteção individual. Use avental e luvas descartáveis quando manusear materiais de imunoenensaio.
- c) Manipule e descarte todos os reagentes e materiais de acordo com os regulamentos aplicáveis.

ADVERTÊNCIA: MATERIAL DE RISCO BIOLÓGICO

Este reagente pode conter algum material de fonte animal e/ou humana (ex. Soro) ou materiais usados em conjunto com materiais de origem humana. Manuseie todos os reagentes e amostras em um nível de Biossegurança 2, conforme recomendado para qualquer material humano potencialmente infeccioso no manual do Centro de Controle de Doenças / Institutos Nacionais de Saúde "Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e Microbiológicos", 5ª Edição, 20071.

AVISO: POTENCIAL PERIGO QUÍMICO

Alguns reagentes neste kit contêm Pro-Clean 400 e azida sódica² como conservante. Pro-Clean 400 e Azida sódica em quantidades concentradas são irritantes para a pele e membranas mucosas.

Para mais informações sobre substâncias perigosas no kit, favor consultar o MSDS, tanto em AnshLabs.com ou por solicitação.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- a) Tipo de amostra recomendada é soro.
 - b) Use as seguintes recomendações³ para o manuseio, processamento e armazenamento de amostras de sangue.
- Deixar as amostras coagulando por 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C e siga as recomendações dos fabricantes dos tubos de coleta para centrifugação. Mantenha os tubos fechados por todo tempo. Dentro de 2 horas após a centrifugação transfira pelo menos 500 μ L de amostra livre de células para o tubo de armazenamento. Imediatamente tampe os tubos fortemente.
 - Se as amostras forem utilizadas dentro de 24 horas podem ser armazenadas a 4°C, de outra forma as amostras devem ser armazenadas a -20°C ou -80°C a fim de evitar perda da bioatividade e contaminação.

- Remova qualquer fibrina residual e material celular antes da análise.
- c) Evite utilizar amostras lipêmicas, hemolisadas ou ictericas.
- d) Cada laboratório deve determinar a aceitabilidade dos próprios tubos de coleta de sangue e dos produtos de separação do soro.
- e) Evite repetidos ciclos de congelamento e descongelamento de amostras. Descongelar as amostras não mais do que 3 vezes.

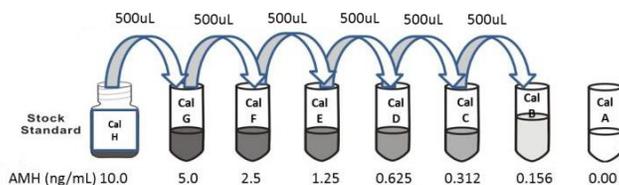
NOTAS DE PROCEDIMENTO

1. Um profundo conhecimento desta bula é necessário para o uso bem sucedido do ensaio bovino AMH ELISA. É de responsabilidade do laboratório a validação do ensaio para a sua utilização. Resultados precisos apenas serão obtidos através da utilização de técnicas de laboratório precisas e seguindo o protocolo informativo.
2. Uma curva de calibração deve ser incluída a cada ensaio.
3. Deixar todos os reagentes à temperatura ambiente antes do uso. Misture bem os reagentes antes de usar por inversão suave. Não misturar vários lotes de qualquer componente do kit e não usar nenhum componente além da data de validade.
4. Use uma ponteira limpa descartável para cada reagente, calibrador, controle ou amostra. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, a contaminação das soluções de substrato com os conjugados HRP. A enzima utilizada, como indicado na etiqueta, é inativada por oxigênio, e é altamente sensível à contaminação microbiana, azida sódica, ácido hipocloroso e cloro-hidrocarbonetos aromáticos frequentemente encontrados na água de abastecimento de laboratório. Use água deionizada.
5. Uma lavagem incompleta irá afetar negativamente o resultado e a precisão do ensaio. Cuidados devem ser tomados para adicionar TMB nos poços a fim de minimizar os desvios de ensaio devido à variação no tempo de incubação do TMB. Evite a exposição dos reagentes ao calor excessivo ou à luz solar direta.

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

1. AMH Calibradores:

- a) Bata e reconstitua o Calibrador H AMH Bovino com 2 mL de água deionizada. Solubilizar por 10 minutos, homogeneizar muito bem antes do uso.
- b) Prepare 7 tubos de poliestireno e identifique-os como Cal A, Cal B, Cal C, Cal D, Cal E, Cal F e Cal G.
- c) Adicione 500 µL do Calibrador AMH A/Diluyente de Amostra em cada tubo de poliestireno identificados de A-G.
- d) Adicione 500 µL do Calibrador AMH H reconstituído (etapa a) para o tubo identificado como Cal G. Homogeneizar em vórtex e misturar o conteúdo do tubo completamente antes da próxima transferência e diluição.
- e) Adicione 500 µL do Cal G (etapa d) para o tubo identificado como Cal F. Homogeneizar em vórtex e misturar o conteúdo do tubo completamente antes da próxima transferência e diluição.
- f) Adicione 500 µL do Cal F (etapa e) para o tubo identificado como Cal E. Homogeneizar em vórtex e misturar o conteúdo do tubo completamente antes da próxima transferência e diluição.
- g) Adicione 500 µL do Cal E (etapa f) para o tubo identificado como Cal D. Homogeneizar em vórtex e misturar o conteúdo do tubo completamente antes da próxima transferência e diluição.
- h) Adicione 500 µL do Cal D (etapa g) para o tubo identificado como Cal C. Homogeneizar em vórtex e misturar o conteúdo do tubo completamente antes da próxima transferência e diluição.
- i) Adicione 500 µL do Cal C (etapa h) para o tubo identificado como Cal B. Homogeneizar em vórtex e misturar o conteúdo do tubo completamente antes da próxima transferência e diluição.
- j) Nota: Cal B pode ser diluído até 0.039 ng/mL utilizando o Cal A.
- k) O tubo identificado como Cal A contém 500 µL de Diluyente AMH Calibrador A/Diluyente de Amostra e possui 0 concentração de AMH e deve ser utilizado como Branco.
- l) Os Calibradores de A-H, por exemplo, devem ser lidos como 0.0 ng/mL, 0.156 ng/mL, 0.312 ng/mL, 0.625 ng/mL, 1.25 ng/mL, 2.5 ng/mL, 5.0 ng/mL e 10 ng/mL. Aliquotar e congelar a solução estoque AMH CAL H imediatamente para usos posteriores. Evite ciclos repetidos de degelo. Aliquotas congeladas a -20°C são boas por 1 ano.
- m) A concentração de AMH Bovino no calibrador H é rastreável para calibradores internos do fabricante. Os valores atribuídos por outras metodologias podem ser diferentes. Tais diferenças, se presentes, podem ser causadas por desvios entre os métodos.



2. Solução de Lavagem: Dilua a Solução de lavagem concentrada 25 vezes com água deionizada. A solução de lavagem é estável por 1 mês a temperatura ambiente quando armazenada em frasco completamente selado.

3. Poços de Microtitulação: Selecione o número de poços revestidos para o ensaio. Os poços remanescentes não utilizados devem ser colocados na embalagem original com dessecante. A embalagem deve ser fechada novamente para proteger da umidade.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Permitir que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente e homogeneizar muito bem por inversão suave antes do uso. Calibradores e amostras devem ser testados em duplicata.

NOTA: Todas as amostras de soro que tiverem leitura maior do que o calibrador mais alto devem ser homogeneizadas e diluídas com o calibrador 0 ng/mL/ Calibrador A diluyente de amostra antes do ensaio.

1. Identifique as tiras de Microtitulação a serem utilizadas.
2. Pipete 50 µL dos Calibradores (Cal A-G) e amostras nos poços apropriados.
3. Adicione 50 µL de Tampão de Ensaio AMH em cada poço utilizando uma pipeta dispensadora.
4. Incubar a placa, agitando em velocidade rápida (600-800 rpm) em agitador orbital de placas, por 120 minutos a temperatura ambiente.
5. Aspirar e lavar cada tira por 5 vezes com a Solução de Lavagem utilizando uma lavadora de placa automática.
6. Adicionar 100 µL de Conjugado Biotina-Anticorpo (pronto para uso) em cada poço utilizando uma pipeta dispensadora.
7. Incubar a placa, agitando em velocidade rápida (600-800 rpm) em agitador orbital de placas, por 60 minutos a temperatura ambiente.
8. Aspirar e lavar cada tira por 5 vezes com a Solução de Lavagem utilizando uma lavadora de placa automática.
9. Adicionar 100 µL de Conjugado AMH Enzima-Estreptavidina (pronto para uso) em cada poço utilizando uma pipeta dispensadora.
10. Incubar a placa, agitando em velocidade rápida (600-800 rpm) em agitador orbital de placas, por 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Aspirar e lavar cada tira por 5 vezes com a Solução de Lavagem utilizando uma lavadora de placa automática.
12. Adicionar 100 µL de Solução Cromógena TMB em cada poço utilizando uma pipeta dispensadora. Evite a exposição direta a luz solar.
13. Incubar os poços, agitando de 600-800 rpm em agitador orbital de placas, por 10-12 minutos a temperatura ambiente.
14. Adicionar 100 µL de Solução de Parada em cada poço utilizando uma pipeta dispensadora. Leia a absorbância da Solução contida nos poços dentro de 20 minutos, utilizando uma leitora de placa ajustada para 450 nm.

NOTA: Monitore visualmente o desenvolvimento de cor a fim de otimizar o tempo de incubação.

NOTA: Durante a leitura da absorbância no poço de microtitulação, é necessário programar o calibrador zero (Cal A) como um "Branco".

RESULTADOS

NOTA: Os resultados neste protocolo foram calculados plotando os dados em uma escala log vs. log e usando uma curva de regressão de ajuste cúbico. Outros métodos de redução de dados podem gerar resultados ligeiramente diferentes.

1. Calcule a densidade ótica média (DO) para cada calibrador, Controle e Amostra.
2. Coloque o log das médias de leituras de DO para cada Calibrador ao longo do eixo y-axis versus log das concentrações de AMH em ng/mL ao longo do eixo x-axis, utilizando um ajuste de curva de regressão cúbica.
3. Determine as concentrações de AMH para as amostras a partir da curva de calibração combinando as médias de leituras de DO com a concentração de AMH correspondente.

- Qualquer leitura maior que o Calibrador mais alto deve ser apropriadamente diluída com o 0 ng/mL (CAL A / Sample Diluent) e ensaiada novamente.
- Qualquer amostra com leitura inferior a sensibilidade analítica deve ser reportada como tal.
- Multiplique o valor pelo fator de diluição, se necessário.

LIMITAÇÕES

Os reagentes fornecidos neste kit são otimizados para medir os níveis de AMH em soro bovino. Se houver evidência de contaminação microbiana ou excesso de turvação num reagente, descartar o frasco. Nos ensaios que utilizam anticorpos, existe a possibilidade de interferência de anticorpos heterofílicos nas amostras.⁴

CONTROLE DE QUALIDADE

- Cada laboratório deve estabelecer os valores médios e limites aceitáveis para garantir um desempenho adequado.
- Cada laboratório deve estabelecer intervalos de controles internos de AMH. Os resultados devem estar dentro dos limites de confiança estabelecidos.
- Uma curva de calibração completa, e controles, devem ser incluídos em cada ensaio.
- TMB deve ser incolor. Desenvolvimento de qualquer cor pode indicar contaminação do reagente ou instabilidade.

DADOS REPRESENTATIVOS DE CURVA DE CALIBRAÇÃO

Número do Poço	Conteúdo do Poço	Média de Absorbância	Conc.(ng/mL)
A1, A2	Calibradores A	0.045 (Blank)	0
B1, B2	B/4	0,030	0,039
C1, C2	B/2	0,062	0,078
D1, D2	B	0,124	0,156
E1, E2	C	0,251	0,312
F1, F2	D	0,484	0,625
G1, G2	E	0,969	1,25
H1, H2	F	1.703	2,5
A3, A4	G	2.809	5,0

CUIDADO: Os dados acima não devem ser utilizados no lugar dos dados obtidos pelo usuário no laboratório

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Todas as características analíticas estão estabelecidas em ng/mL (1 ng/mL AMH = 7.14 pM)

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica do ensaio, conforme calculado pela interpolação da média mais dois desvios-padrão de 14 replicatas do calibrador A (0 ng / mL) e calibrador B /4 (0,039 ng/mL) é de 0,011 ng/ml.

IMPRECISÃO

Três amostras de controle foram ensaiadas em 24 replicatas para determinar a precisão intra-ensaio. Os valores obtidos são mostrados abaixo.

Amostras	Média Conc. (ng/mL)	SD	%CV
Pool-1	0.611	0.018	2.92
Pool-2	1.259	0.032	2.54
Pool-3	2.56	0.0933	3.65

LINEARIDADE

Com base no NCCLS EP-6-P múltiplas diluições das três amostras de soro Bovino contendo vários níveis de AMH foram diluídas com o Calibrador A/diluyente de amostra. A % de recuperação em amostras individuais é representado na tabela seguinte.

Amostra	Fator de Diluição	Conc. Esperada (ng/mL)	Conc. Observada (ng/mL)	% Recuperação
1	Puro	7.468	NA	NA
	1:2	3.734	3.731	100%
	1:4	1.867	1.973	106%
	1:8	0.934	0.980	105%
	1:16	0.467	0.511	109%
2	Puro	5.010	NA	NA
	1:2	2.505	2.450	98%
	1:4	1.253	1.261	101%
	1:8	0.626	0.665	106%
	1:16	0.313	0.334	107%
3	Puro	4.530	NA	NA
	1:2	2.265	2.199	97%
	1:4	1.133	1.154	102%
	1:8	0.566	0.588	104%
	1:16	0.283	0.297	105%

REFERÊNCIAS

- HHS Publication, 5th ed., 2007. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Available <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5>
- DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
- Approved Guideline – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Kricka L. Interferences in immunoassays – still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038.

Importado e distribuído por:



Genese Produtos Diagnósticos Ltda.
Rua Diogo Vaz, 291 – CAMBUCI
CNPJ. 68.384.155/0001-02
CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

Fabricado por:



Ansh Labs
445 Medical Center Blvd.
Webster, TX 77598-4217, U.S.A.
Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-33416987