

Immunoensayo Enzimático para la Determinación Cuantitativa de Inhibina A (INHA), en Suero, Plasma, Sobrenadantes de Cultivos Celulares, Fluidos Corporales y Tejidos homogenizados Humanos

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo enzimático de Inhibina A (INHA) humana.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

En el ensayo inmunoenzimático para INHA los pozos están recubiertos de anticuerpos anti-INHA policlonales y conjugado INHA-HRP. La muestra a procesar y la solución lisante son incubados en conjunto con el conjugado INHA-HRP en los pocillos recubiertos por una hora. Después del periodo de incubación, se decantan los pozos y son lavados cinco veces. Los pozos entonces son incubados con un sustrato para la enzima HRP. El producto de la reacción enzima-sustrato forma un complejo de color azul. Finalmente, se añade la solución de paro en los pocillos virando a color amarillo la solución. La intensidad de color es medida espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de microelisa. La intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de INHA, las muestras con INHA y el conjugado INHA-HRP compiten por el sitio de unión del anticuerpo anti-INHA. Dado que el número de sitios es limitado, la mayor parte de dichos sitios están ocupados por INHA de la muestra, quedan pocos sitios para enlazar el conjugado INHA-HRP. Los estándares con diferentes concentraciones de INHA son procesados simultáneamente con las muestras a ensayar y se traza una curva de acuerdo a la intensidad de color (densidad óptica) y la concentración de INHA. La concentración de INHA en cada muestra se interpola en esta curva estándar.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Placa con 96 micropozos
2. Enzima conjugada
3. Estándares de referencia 0, 50, 100, 250, 500 y 1000 pg/mL
4. Sustrato A
5. Sustrato B
6. Solución de paro
7. Buffer de lavado concentrado
8. Solución lisante**
9. Instructivo

****Nota:** La solución lisante solo se debe utilizar cuando la muestra es un sobrenadante de cultivo celular, fluido biológico, tejido homogeneizado; si la muestra es suero o plasma sanguíneo, entonces la solución lisante es un reactivo superfluo.

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada

4. Incubadora a 37°C
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadrado
7. Un lector de MicroElisa.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

Suero: Utilizar un tubo separador de suero (SST) y permita que la muestra coagule durante 30 minutos antes de su centrifugación durante 15 minutos a aproximadamente 1000xg. Separar el suero y realizar el ensayo de manera inmediata o prepare alícuotas y almacénelas a -20°C o -80°C

Plasma: Recolecte el plasma utilizando un tubo con anticoagulante como EDTA o heparina. Centrifugue las muestras por 15 minutos a 1000xg entre 2-8°C en los 30 minutos después de su recolección. Almacene las muestras a -20°C o -80°C. Evite varios ciclos de congelación y descongelación.

Sobrenadante de cultivos celulares y otros fluidos biológicos: Remueva las partículas por centrifugación y realice el ensayo de manera inmediata o bien prepare alícuotas y almacénelas a -20°C o -80°C. Evite varios ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Suero, plasma y sobrenadantes de fluidos de cultivos celulares pueden ser usados en los primeros 7 días si son almacenados entre 2-8°C, en caso contrario las muestras pueden ser almacenadas a -20°C (≤ 2 meses) o -80°C (≤ 6 meses) para evitar pérdida de bioactividad y contaminación. Evite varios ciclos de congelación-descongelación. Cuando se realiza el ensayo, permita que las muestras lleguen a temperatura ambiente lentamente, no utilice algún tratamiento térmico a las muestras.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. El usuario debe calcular la cantidad posible de muestras utilizadas en su totalidad para el examen. Por favor, reserve con antelación la suficiente cantidad de muestras.
2. Por favor prediga la concentración antes de ensayar. Si los valores de estos no se encuentran dentro del rango de la curva estándar, los usuarios deben determinar el óptimo para la dilución de la muestra en particular para el ensayo.
3. Debido a la posibilidad de coincidencia entre antígeno de otros recursos y anticuerpo utilizado en nuestros equipos (ejemplo anticuerpo dirigido en conformación con epítope en lugar de epítope lineal, algunas proteínas recombinantes o nativos de otros fabricantes no pueden ser reconocidos por nuestros productos.
4. Influenciada por los factores incluyendo viabilidad celular, el número de células y también el tiempo de muestreo, muestras de sobrenadantes de cultivo celular podrían no ser detectadas por el kit.
5. Se recomiendan para el ensayo, muestras frescas sin almacenamiento de largo plazo. De lo contrario, la desnaturalización y degradación de las proteínas puede ocurrir en esas muestras y finalmente conducir a resultados erróneos.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Dispense 10 µL de solución lisante en 100 µL de muestra, mezcle y deje en reposo por una hora (la proporción de la solución lisante y muestras no debe ser menor a 1:10). (Nota: Este paso es necesario cuando la muestra es líquido celular, fluido corporal o tejido homogeneizado; si la muestra es suero o plasma sanguíneo, este paso debe ser omitido).
3. Solución de lavado, diluir 10 mL de buffer de lavado concentrado en 990 mL de agua destilada o desionizada para preparar 1000 mL de solución de lavado (1x)

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Preparar los estándares antes de iniciar el procedimiento del ensayo (por favor lea la sección de PREPARACIÓN DEL REACTIVO). Se recomienda que todos los estándares y las muestras se corran por duplicado.

1. Asegurar el número deseado de pozos recubiertos en el soporte y añadir 100 µL de estándar o muestras al pozo apropiado con el anticuerpo pre-revestido de la micro placa.
2. Añadir 50 µL de conjugado a cada pozo. Mezclar bien. El mezclado completo en este paso es muy importante. Cubrir e incubar por 1 hora a 37° C.
3. Lavar la placa de micropozos mediante uno de los métodos específicos indicados a continuación: **Lavado Manual:** Remover la mezcla de incubación por aspiración del contenido de la placa en un receptor o contenedor de desecho adecuado. Usando una botella de presión, rellenar cada uno de los pozos completamente con solución de lavado, entonces, aspirar el contenido de la placa en un receptor o un contenedor de desecho adecuado. Repita este procedimiento cuatro veces más para un total de cinco lavados. Después del lavado final, invertir la placa y secar por golpeteo en papel absorbente o toallas de papel hasta que desaparezca la humedad. Nota: Mantenga los lados del marco de la placa firmemente al lavar la placa para asegurar que todas las tiras se aseguren en el marco. **Lavado Automatizado:** Aspirado de todos los pozos y lavar a continuación la placa cinco veces con solución de lavado. Ajustar siempre la arandela de aspirado tanto el líquido y si es posible establecer el volumen de llenado en 350 µL/pozo/lavado (rango: 350-400 µL). Después del lavado final, invertir la placa y secar por golpeteo en papel absorbente o toallas de papel hasta que desaparezca la humedad. Nota: Mantenga los lados del marco de la placa firmemente al lavar la placa para asegurar que todas las tiras se aseguren en el marco. Se recomienda que se ajuste la arandela para un tiempo de remojo de 10 segundos o de agitación con un tiempo de 5 segundos entre lavados.
4. Añadir 50 µL de Substrato A y 50 µL de sustrato B a cada pozo, subsecuentemente. Cubrir e incubar durante 10 minutos a 20-25° C. (evitar la luz solar)
5. Añadir 50 µL de Solución de Paro a cada pozo. Mezclar bien.
6. Leer la densidad óptica (D.O.) a 450 nm utilizando un lector de placa de micropozos inmediatamente.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Elabore una curva estándar para determinar la cantidad en una muestra desconocida. La curva estándar se genera trazando el promedio de D.O. (450 nm) obtenidos para cada una de las seis concentraciones estándar sobre el eje vertical (Y) frente a la concentración correspondiente en el eje horizontal (X).
2. Calcular el valor medio de D.O. para cada estándar y muestra. Todos los valores de D.O. son restados del valor promedio del estándar cero antes de la interpretación del resultado. Construir la curva es-

tándar usando papel milimétrico o software estadístico.

3. Para determinar la cantidad de cada muestra, primero busque el valor de la D.O. en el eje Y. Posteriormente extender una línea horizontal a la curva estándar. En el punto de intersección, dibuje una línea vertical en el eje X y leer la concentración correspondiente.
4. Cualquier variación en la operación, pipeteo y técnica de lavado, edad del equipo, temperatura y tiempo de incubación pueden causar variación en el resultado. Cada usuario debe obtener su propia curva estándar.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

1. La sensibilidad de este ensayo es de 1.0 pg/mL
2. Este ensayo presenta una alta sensibilidad y excelente especificidad para la detección de INHA. No se encontró reactividad cruzada o interferencias significativas entre INHA y análogos. (NOTA: Limitada por estudios y habilidades actuales, es imposible para nosotros completar la detección de reactividad cruzada entre INHA y todos los análogos, por lo tanto, se puede presentar reacción cruzada en algunos casos).

NOTAS DE SEGURIDAD

1. Este kit contiene pequeñas cantidades de azida sódica. La azida sódica reacciona con el plomo de una tubería de cobre para formar azidas metálicas explosivas. Tras el desecho, limpie los desagües con un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azida sódica. Evitar la ingestión y el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. En caso de contacto, enjuague el área afectada con abundante agua. Observar todas las regulaciones federales, estatales y locales para la eliminación.
2. Todos los componentes sanguíneos y materiales biológicos, deben considerarse potencialmente infecciosos. Seguir precauciones universales como establecido por los centros para el control y la prevención de enfermedades y de la administración de seguridad y salud ocupacional para la manipulación y eliminación de agentes infecciosos

CONTROL DE CALIDAD

1. Cuando no se utilice el kit, todos sus componentes deben ser almacenados en refrigeración. Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso.
2. La micro placa debe estar a temperatura ambiente antes de abrir el empaque. Remueva los pozos a trabajar e inmediatamente guarde el resto de los pozos en la micro placa entre 2-8°C para asegurar su integridad.
3. Las muestras deben ser colectadas en tubos libres de pirógenos/endotoxinas.
4. Las muestras deben ser congeladas si no se analiza poco después de la recolección. Evitar varios ciclos de congelación y descongelación de muestras congeladas. Descongele completamente y mezclar bien antes de realizar el análisis.
5. En lo posible evite muestras hemolizadas o lipémicas. Si existen grandes cantidades de partículas están presentes, centrifugue y filtre antes de realizar el análisis.
6. Se recomienda procesar, estándares, controles y muestras por duplicado
7. Se recomienda en el pipeteo de reactivos mantener un orden consistente en la adición pozo por pozo, para mantener un tiempo de incubación equilibrado en todos los pozos.
8. Tape los reactivos cuando no los esté utilizando.
9. No mezcle o intercambie reactivos de diferentes lotes de kit.
10. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.

11. Lea la absorbancia en las dos primeras horas de haber terminado el ensayo.
12. El control se debe ejecutar en cada ensayo. Si los valores de control quedan fuera del rango pre-establecido, la precisión del ensayo es sospechosa.
13. La solución de lavado debe ser drenada de los micropozos por una eficiente aspiración o decantación seguida de un secado en papel absorbente. Nunca introduzca el papel absorbente en los micropozos.
14. El cromógeno es sensible a la luz, evite la exposición prolongada a la luz. También evite el contacto entre metales y el cromógeno, de lo contrario puede desarrollar color.
15. Un lavado incompleto puede afectar directamente en los resultados del test. Todos los lavados deben ser realizados con el buffer de lavado proporcionado.

REFERENCIAS

1. Burger HG, Igarashi M (1988). "Inhibin: definition and nomenclature, including related substances". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 66 (4): 885–6. 2.
2. Robertson DM, Burger HG, Fuller PJ (2004). "Inhibin/activin and ovarian cancer". *Endocrine-related Cancer* 11 (1): 35–49. 3.
3. Ying SY (December 1987). "Inhibins and activins: chemical properties and biological activity". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 186 (3): 253–64.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO DIAGNOSTICS
1155 CHESS DR STE 121
FOSTER CITY, CA USA 94404