

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОЙ БЕТА-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА

4221-16, Free Beta HCG

Каталог. № : 4221-16

Методика от 10-10-2009

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	Free Beta HCG
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Пероксидаза - Конъюгат ИФА
Диапазон обнаружения	0-50 мЕд/мл
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	100 %
Чувствительность	0.5 мЕд/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12-14 месяцев

**Лабораторные анализы не могут быть единственными критериями для медицинского заключения. История болезни пациента и последующие тесты должны быть приняты во внимание.*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного измерения *in vitro* человеческого хорионического гонадотропина свободной бета субъединицы в сыворотке человека. (Только для использования квалифицированным персоналом).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор является твердо фазовый энзимно-связанным иммунсорбентным набором. В анализе используется одно анти- β -hCG антитело для иммобилизации твердой фазы (микротитрационные лунки) и мышинное моноклональное анти- β -hCG антитело в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгата. Тестовый образец (сыворотка) добавляется к β -hCG антителу, привитому к микрочайкам, и инкубируется с нулевым буфером. Если β -hCG присутствует в образце, он связывается с антителом на ячейках. Потом лунки промываются для удаления оставшегося тестового образца, и добавляется β -hCG антитело, меченное пероксидазой хрена (конъюгат). Конъюгат связывается иммунологически с β -hCG на ячейках, в результате чего молекулы β -hCG будут в сэндвиче между твердой фазой и энзимно-связанными антителами. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется на 20 минут, в результате происходит развитие голубого окраса. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация β -hCG прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора:

1. Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
2. Референтные стандарты: 0, 2.5, 5, 10, 25, 50 мМЕ/мл в образце, разбавленном в соответствии с IRP 75/551 ВОЗ. (1 мМЕ/мл = 1 нг/мл для β -hCG). Лиофилизированные стандарты развести 0.5 мл дистиллированной воды перед использованием.
3. Нулевой буфер (разбавитель образцов), 20 мл
4. Реагент ферментного конъюгата, 18 мл.
5. ТМВ субстрат, 12 мл.
6. Концентрат Промывочного буфера (50X), 15 мл.
7. Стоп раствор, (1 N HCl) 12 мл.

Материалы, не входящие в состав поставки:

1. Точные пипетки: 0.04-0.2 мл, 0.2-1.0 мл.
2. Одноразовые наконечники для пипеток.
3. Дистиллированная вода.
4. Вихревой смеситель или аналог.
5. Промокательная бумага или бумажное полотенце.
6. Бумага для построения графиков.

7. Микропланшетный луночный ридер.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Набор предназначен для работы с образцами сыворотки без добавок.

ХРАНЕНИЕ НАБОРОВ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Невскрытые наборы после получения следует хранить при 2-8°C, а планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем. Чтобы минимизировать попадание влажного воздуха. Набор анализа может использоваться в течении срока годности (Один год от даты производства). Срок годности указан на этикетке упаковки.
2. Вскрытые наборы остаются стабильными до окончания срока пригодности при хранении согласно инструкции.
3. Подходящим является микропланшетный ридер с шириной дорожки 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием доведите реагенты до комнатной температуры (18-22°C).
2. Разведите каждый лиофилизированный стандарт 0.5 мл дистиллированной воды. Выдержите разведенный материал 20 минут. Разведенные стандарты должны храниться при 2-8°C и сохраняют стабильность в таких условиях две недели.
3. Разбавьте 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разбавьте 15 мл концентрата промывочного буфера (50x) в дистиллированной воде, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Закрепите нужное количество лунок с антителами в штатив.
2. Внесите по **50 мкл** стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите по **100 мкл** нулевого буфера в каждую лунку.
4. Тщательно перемешивайте в течении **10 секунд**. Очень важно достичь полного смешивания на этом этапе.
5. Инкубировать **30 минут** при 37°C.
6. Удалите инкубационную смесь из планшета в раковину.
7. Промойте планшет 4 раза промывочным буфером (1x), и 1 раз дистиллированной водой, каждый раз удаляя его содержимое.
8. Резко постучать планшетом по растленному листу промокательной бумаги или бумажного полотенца для удаления остатков жидкости.
9. Внесите по **150 мкл** реагента ферментного конъюгата в каждую лунку. Легко перемешайте содержимое лунок в течении 5 секунд.
10. Инкубируйте при 37°C в течении 30 мин. Удалите содержимое лунок в раковину.
11. Промойте планшет 4 раза промывочным буфером (1x) и 1 раз дистиллированной водой.
12. Перевернуть планшет и легко постучать им по растленному листу фильтровальной бумаги или бумажного полотенца для удаления остатков жидкости.
13. Внесите по 100 мкл раствора ТМВ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
14. Инкубируйте при комнатной температуре в темном месте в течении 20 мин.
15. Остановите реакцию внесением **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
16. **Аккуратно перемешивайте на протяжении 5-30 секунд до полного изменения окраски раствора из синей на желтую.**
17. Используя ридер для планшетов, измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм на протяжении 30 мин.

Внимание:

Процедура промывки имеет большое значение. При недостаточно тщательном промывании результаты будут неточными, и уровень поглощения будет завышен.

ОГРАНИЧЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный количественный набор предназначен для *in vitro* диагностики. Компоненты этого набора предназначены для цельного использования. Не смешивайте компоненты разных серий.
2. Абсорбция для количественного анализа равна 50 мЕд/мл β -hCG. Рекомендуется разбавлять образцы, что не попадают в указанный диапазон, разбавителем образцов (нулевым буфером).

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитать средние значения поглощения (A_{450}) для каждого из референтных стандартов, контрольных сывороток и образцов. На бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в нг/мл на горизонтальной оси (X). С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию β -hCG в ММЕ/мл.

ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты получают со считыванием оптической плотности при 450 нм на оси Y по отношению к концентрациям β -HCG на оси X. Пример построения калибровочной кривой приведен только в качестве иллюстрации. Ее нельзя использовать для расчета неизвестных значений. Каждый пользователь должен получить свои собственные данные и калибровочную кривую.

β -hCG (ММЕд/мл)	Поглощение (450 нм)
0	0,021
2,5	0,122
5,0	0,247
10,0	0,573
25,0	1,662
50,0	3,231

Ожидаемые значения и показания Количественного Анализа Free β -ХГЧ:

- На ранних сроках беременности концентрации свободного β -ХГЧ составляют 10 ~ 80 ММЕд/мл. Соотношение свободного β -ХГЧ/нетронутому ХГЧ составляет 3.08 ~ 3.28 процента. После 6-7 недель значения свободного β -ХГЧ и значения коэффициента снизилось. Во время второго и третьего триместра беременности постоянное соотношение наблюдалось у около 1 процента пациентов.
- Образцы сыворотки от 40 нормальных субъектов были исследованы, в этой популяции 99% от значений были меньше, чем 0,4 ММЕд/мл. Уровни Сывороточных ХГЧ и свободных субъединиц в сыворотке пациентов с гестационной хориокарциномой были зарегистрированы в следующей редакции: (Ozuturk соавт. Эндокринологии, 1987)

Patient No	HCG (mIU/ml)	α -hCG (mIU/ml)	β -hCG(mIU/ml)
1	210,000	112	8,000
2	22,195	20	1,300
3	6,840	1	232
4	36,000	44	3,900
5	4,200	2	350

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Точность:

1) Внутрисерийная:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	16	4.22	0.09	2.23
Уровень 2	16	8.54	0.21	2.49
Уровень 3	16	20.16	1.23	6.09

2) Между сериями:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	16	4.36	0.29	6.70
Уровень 2	16	9.22	0.65	7.10
Уровень 3	16	20.05	1.42	7.10

II. Линейность:

Две сыворотки пациента с серийно разводили Разбавителем для образцов в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 103.4 %.

Образец А			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	26.1	26.1	
2X	13.1	12.9	98.7
4X	6.5	5.9	90.8
8X	3.3	3.1	93.6
16X	1.6	1.8	113.0
Среднее восстановление: 99.0 %			

Образец В			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	36.6	36.6	
2X	18.3	21.3	116.3
4X	9.2	9.3	101.8

8X	4.6	4.4	96.0
16X	2.3	2.4	103.4
Среднее восстановление: 104.4 %			

III. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известным уровнем пролактина смешивались и анализировались в дубликатах. Среднее восстановление составило 99.95 %.

Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
37.47	35.59	95.0
21.40	19.99	93.4
11.36	11.68	102.8
6.07	5.90	102.9
3.04	2.98	102.0
2.02	1.95	103.6
Среднее восстановление: 94.9 %		

IV. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 0.5 ММЕд/мл.

V. Перекрестная реактивность

Следующие антигены маркеров рака в высоких концентрациях были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Conc.	Equivalent HCG	% Cross-Reactivity
TSH	1,000 IU/ml	0.0 mIU/ml	0.00
FSH	5,000 mIU/ml	0.0 mIU/ml	0.00
Prolactin	1,000 ng/ml	0.68 mIU/ml	0.07
LH	1,000 mIU/ml	4.88 mIU/ml	0.49
α -hCG	5,000 ng/ml	1.25 mIU/ml	0.03
Intact hCG	1,000 mIU/ml	7.24 mIU/ml	0.72

VI. Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался в данном анализе



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com