



Набір для визначення
ХОРИОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ БЕТА
b-HCG IEMA WELL

Кат. № : KP14IW
Кількість : 96
Виробник : Radim (Італія)

Методика від 09-10-2003

ВСТУП
Хоріонічний гонадотропін (ХГ) – глікопротеїн (молекулярна маса: 38000 дальтон) з приблизним вмістом карбогідрату 30% та 9% сіалової кислоти (1), який звичайно виробляється синцитіотрофобластовими клітинами плаценти під час вагітності. Молекула складається з альфа- і бета-субодиниць. Альфа-субодиниця майже ідентична з такою інших глікопротеїнових гормонів, таких як Тиреоїд Стимулюючий Гормон (ТТГ), Лютеїнізуючий Гормон (ЛГ) і Фолікулостимулюючий Гормон (ФСГ). Бета-субодиниця характеризується послідовністю 30 амінокислот в С-терміналі, які є специфічними для кожного з гормонів (2, 3, 4). В даному випадку унікальна біологічна як і імунологічна активність притаманна кожному гормону. Тому, специфічний ХГ аналіз можливий тільки за допомогою антитіл, спрямованих проти бета-субодиниці (5, 6). Найбільш важлива функція ХГ полягає у підтримці жовтого тіла у виробленні естрадіолу і прогестерону, таким чином підтримуючи вагітність. До того ж в чоловічому плоді ХГ стимулює клітини Лейдига до продукування тестостерону, ведучи до статевої диференціації. Після запліднення рівень ХГ різко зростає і досягає максимуму до кінця першого триместру. Високі концентрації спостерігаються під час всієї вагітності. Після народження рівень ХГ в сироватці швидко зменшується і до кількох днів досягає величин, що не піддаються визначенню. Набір дозволяє проводити раннє діагностування вагітності. Також разом з підвищенням концентрації ХГ під час вагітності її зростання може бути обумовлене пухлинами трофобластного і нетрофобластного походження, такі як гідатіформна хвороба, хоріонепітеліома, карцинома ембріональних клітин і багато інших.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Даний набір базується на імуоферментометричному аналізі (ЕІМА). В ньому використовуються два різні анти-ХГ моноклональні антитіла, одними покриті лунки а інші кон'юговані до пероксидази хрому (HRPO). Впродовж першої інкубації ХГ в калібраторах і пробах водночас прив'язується до двох моноклонів, утворюючи «сендвіч». Після цієї інкубації весь незв'язаний матеріал видаляються шляхом аспірації та промивки.

Ферментна активність осаду в лунках, яка прямо пропорційна концентрації ХГ в калібраторах і пробах буде спостерігатися при внесенні розчину хромогену (ТМВ) в буфер субстрату в лунках. Колориметричне зчитування здійснюється за допомогою спектрофотометра при 450 і 405 нм.

РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ: ПРИГОТУВАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

- реагентів достатньо для проведення 96 тестів
- зберігати набір при 2-8°C
- термін придатності кожного реагента вказаний на етикетці флакона.

1. **Покритий мікропланшет:** 1шт. 96 лунок, покритих анти-ХГ-моноклональним антитілом (мишиним). Невикористані лунки необхідно зберігати при 2-8°C в наявному поліетиленовому пакеті та ретельно запечатаними.
2. **Калібратори:** 6 фл. ХГ в основі сироватки, ліофілізовані. Концентрації: 0, 10, 50, 250, 750 та 2000 мМО/мл. Консервант: тімеросал (<0.05%). Розбавити калібратори 1 мл дистильованої води. Після відтворення зберігати при 2-8°C впродовж 2 тижнів, для довшого зберігання слід заморозити до -20°C.

ПРИМІТКА: див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.

3. **Ферментний кон'югат (концентрований),** 1 фл. (2,7 мл) анти-моноклональне антитіло кон'юговане з пероксидазою хрому (HRPO) в Tris HCl, BSA та стабілізаторах. Консервант: неоміцин. Перед використанням додати 1.2 мл ферментного кон'югату до флакона з розчинником кон'югату (12 мл) або розбавити кон'югат 1:11 розчинником кон'югату (виходячи з необхідного об'єму для проведення аналізу) і ретельно перемішати. Зберігати розбавлений кон'югат при 2-8°C впродовж 1 місяця.
4. **Розчинник кон'югату:** 2 фл. (12 мл) Tris-HCl та BSA. Готовий до використання. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0.05%).
5. **Контрольна сироватка:** 1 фл. ХГ в основі сироватки. Ліофілізована. Консервант: неоміцин та тімеросал (<0.05%). Розвести 1 мл дистильованої води. Після розведення зберігати при 2-8°C 2 тижні; для довшого зберігання заморозити до -20°C.

ПРИМІТКА: див. листок сертифікату якості за більш точними даними по концентраціях.

6. **Розчинник проби:** 1 фл. (100 мл) основи сироватки. Готовий до використання. Консервант: неоміцин.
7. **Промивний розчин (концентрований):** 1 фл. (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тімеросал (<0.05%). Розвести вміст флакона до 500 мл дистильованою водою. У випадку нерозчинених кристалів, обробіть розчин, розмітивши флакон на декілька хвилин в інкубатор при 37°C. Зберігати розбавлений промивний розчин при 2-8°C впродовж 1 місяця.
8. **Хромоген:** 1 фл. (15 мл) ТМВ (Tetramethylbenzidine) із цитрат-фосфатним буфером і DMSO. Рідкий.
9. **Буфер субстрату:** 1 фл. (15 мл) цитрат-фосфатного буфера і H₂O₂. Рідкий.

ПРИМІТКА: щоб отримати розчин субстрату змішайте рівні кількості хромогену (9a) із буфером субстрату (9b), використовуючи темний ретельно очищений флакон. Уникайте прямого попадання світла і використовуйте впродовж 1 год. з часу приготування.

10. **Блокуючий реагент:** 1 фл. (14 мл) N H₂SO₄. Готовий до використання.

- Адгезивна плівка для планшету
- Поліетиленовий пакет

МАТЕРІАЛИ, ЩО ВИМАГАЮТЬСЯ АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Регульовані, автоматичні мікро піпетки зі змінними насадками.
2. Градуїрована колба.
3. Мікропланшетний струшувач на 1200 об/хв..
4. Помпа для аспірації або автоматизований пристрій для промивки лунок.
5. мікро планшетний фотометр з абсорбцією в межах 0-3,0 А інтервалу при 450 та 405 нм.
6. Міліметровий графічний папір.
7. Дистильована вода.

АВТОМАТИЗОВАНИЙ АНАЛІЗ

- даний аналіз може бути проведений з використанням автоматизованого апарату для ELISA наборів на мікро планшетах.
- Виробник гарантує використання даного набору в автоматизованих апаратах компанії RADIM і/або SEAC.
- При використанні інших автоматизованих мікропланшетних апаратів, відповідальність за правильність аналізів ELISA наборів у них несе користувач.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ та ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Не змішуйте реагенти різних партій.
2. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
3. використовуйте ретельно очищений лабораторний посуд, вільний від забруднення іонами металів або окислюючі речовин.
4. Використовуйте дистильовану воду, що зберігається в ретельно очищених ємкостях.
5. уникайте забруднення проб. З цією метою для кожної проби та реагента використовуйте змінні насадки.
6. Виконуйте чітко вимоги щодо інкубації як описано в розділі «Процедура аналізу».

Для того щоб уникнути особистого зараження та забруднення середовища, дотримуйтесь наступних застережень:

7. Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
8. Не піпєтуйте ротом.
9. Не їжте, не пийте, не куріть і не користуйтеся косметикою в процесі аналізу.
10. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
11. Уникайте розбризкування та утворення аерозолів. У їх випадку ретельно промийте 3% розчином гіпохлориду натрію. Будь-кий очищуючий матеріал такого складу слід вважати потенційно інфекційним та дотримуватись вимог по його утилізації.

ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ПРОБ

Аналіз може проводитись на пробах сироватки. Високо ліпемічні або гемолізовані проби необхідно видалити. Зберігати при 2-8°C 1-2 дні. Для довшого зберігання проби повинні бути заморожені до -20°C. Уникати повторного розморожування/заморожування. Проби з концентраціями ХГ більше 2000 мМО/мл необхідно розвести 1:100 розчинником проби (10 мкл сироватки + 990 мкл розчинника), незалежно від тижня вагітності.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ*

- Доведіть всі реагенти та проби до кімнатної температури.
 - Перед використанням перемішайте перевертаючи проби.
1. Приготуйте лунки для: бланку, калібраторів, контрольної сироватки і проб.
 2. Додайте **20 мкл** кожного калібратора, контрольної сироватки і проби у відповідні лунки.
 3. Додайте в кожну лунку **200 мкл** ферментного кон'югату, крім лунки бланка.
 4. накрийте мікро планшет адгезивною плівкою (постачається в наборі) та легко змішайте;
 5. Інкубуйте лунки впродовж:
 - А) **30 хвилин** при 37°C на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.), або
 - В) **30 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.);
 6. Зніміть адгезивну плівку і ретельно аспіруйте інкубаційну суміш із всіх лунок.
 7. Промийте лунки **4 рази 350 мкл** розбавленого промивного розчину. Спіруйте всю рідину із лунок.
 8. Додайте **200 мкл** розчину Субстрату в кожну лунку (див. розділ реагенти);
 9. Уникайте прямого попадання світла та інкубуйте:
 - А) **15 хвилин** при 37°C на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.), або
 - В) **15 хвилин** при кімнатній температурі на орбітальному струшувачі (1200 об/хв.);
 10. Додайте в кожну лунку **100 мкл** блокуючого реагента;
 11. Зчитайте дані на фотометрі при **450 і 405 нм** з контрольною довжиною хвилі **620 нм** (настроюючи апарат на нуль з лункою бланку). Зчитування провести на впродовж **20 хвилин** після завершення аналізу.

*При використанні в процедурі автоматизованих апаратів компаній RADIM і/або SEAC, зсилайтесь на відповідні інструкції.

СХЕМА АНАЛІЗУ (Див. ст.. 23)

ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використовуючи автоматичні апарати SEAC і/або RADIM для мікропланшетів спектрофотометричне зчитування виконуватиметься автоматично при 3 різних довжинах хвилі: 450, 405 і 620 нм, таким чином розширюючи амплітуду кривої.

Для того, щоб отримати кращу чутливість даний метод використовує спектрофотометричне зчитування при двох довжинах хвилі (450 і 405 нм). Для проб з концентраціями ХГ в діапазоні від 0 до 250 мМО/мл, зчитуються при 450нм; для проб з кількістю ХГ вище 250 мМО/мл, зчитуються при 405 нм.

Намалюйте калібрувальну криву на міліметровому графічному папері, виводячи концентрації калібраторів' (вісь абсцис) проти абсорбції, отриманої для кожного калібратора (вісь ординат). Відповідні концентрації ХГ в мМО/мл отримуються шляхом інтерполяції абсорбції кожної проби на калібрувальній кривій; у разі розбавлених проб перемножте за фактором розбавлення.

ПРИКЛАД ОБЧИСЛЕННЯ

| Опис | Абсорбція 450 нм | ХГ | Абсорбція 405 нм | ХГ |
|------------------------|------------------|-----------|------------------|--------------|
| Калібратор 0 мМО/мл | 0.004 | | 0.001 | |
| Калібратор 10 мМО/мл | 0.062 | | 0.022 | |
| Калібратор 50 мМО/мл | 0.317 | | 0.113 | |
| Калібратор 250 мМО/мл | 1.220 | | 0.435 | |
| Калібратор 750 мМО/мл | 2.827 | | 1.009 | |
| Калібратор 2000 мМО/мл | > 3.000 | | 1.772 | |
| Проба 1 | 0.451 | 75 мМО/мл | 0.161 | |
| Проба 2 | > 3.000 | | 1.440 | 1.400 мМО/мл |

НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення указані нижче є орієнтовними. Рекомендується щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний нормальний діапазон.

| Період вагітності | ХГ сироватки (мМО/мл) |
|-------------------|-----------------------|
| 1 тиждень | 10-50 |
| 2 тиждень | 30 - 300 |
| 3 тиждень | 100-2000 |
| 4 тиждень | 500-10000 |
| 2-3 місяць | 10000-100000 |
| 2 триместр | 5000 - 50000 |
| 3 триместр | 3000 - 30000 |

Вище вказані значення відносяться до стандарту ВОЗ 61/6. перемножте значення на фактор 2,1 для того щоб аналогічне значення відносно ІРР стандарту 75/537.

Критерії достовірності

Перед початком проведення обчислення результатів переконайтеся, що концентрація контрольної сироватки знаходиться в межах вказаних в листку контролю якості.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Специфічність

Даний метод показав перехресну реактивність у 0,68% із LH та перехресну реактивність із FSH, TSH, PRL, hGH та hPL.

Чутливість

Чутливість була визначена на основі калібрувальної кривої і виражена як мінімальна доза, вказуючи на значну різницю із нульовим калібратором (середн. значення + 3 СВ). Ця доза складає 2 мМО/мл.

Точність

Точність була оцінена виходячи із варіативності в межах процедури на між процедурами в 3 сироватках при різних концентраціях ХГ.

В межах процедури (повторюваність)

| Сироватка | Середн. | +/- (мМО/мл) | СВ (станд. відхил.) | КВ % | К-сть реплікатів |
|-----------|---------|--------------|---------------------|------|------------------|
| A | 62.0 | ± | 3.2 | 5.32 | 10 |
| B | 106.8 | ± | 3.7 | 3.40 | 10 |
| C | 466.5 | ± | 10.9 | 2.33 | 10 |

Між процедурами (відтворюваність)

| Сироватка | Середн. | +/- (мМО/мл) | СВ (станд. відхил.) | КВ % | К-сть аналізів |
|-----------|---------|--------------|---------------------|------|----------------|
| A | 66.0 | ± | 4.7 | 7.12 | 10 |
| B | 265.3 | ± | 9.3 | 3.50 | 10 |
| C | 462.6 | ± | 22.0 | 4.86 | 10 |

Ретельність

Ретельність методу була перевірена тестами на відновлення та паралелізм.

Тест на відновлення

Відомі послідовні ХГ були додані до нормальної сироватки та опротестовані.

| Додано (мМО/мл) | Очікувані (мМО/мл) | Отримані (мМО/мл) | Відновлення % |
|-----------------|--------------------|-------------------|---------------|
| S1 | — | — | — |
| S1 + 500 | 500 | 534.6 | 106.0 |
| S1 + 250 | 250 | 244.5 | 97.8 |
| S1 + 125 | 125 | 120.0 | 96.0 |
| S1 + 50 | 50 | 53.4 | 106.0 |
| S1 + 25 | 25 | 26.4 | 105.0 |
| S1 + 10 | 10 | 9.6 | 96.3 |

Паралельний тест

Сироватка з високим вмістом ХГ була протестована при різних розведеннях нульовим калібратором.

| Розбавлення | Очікувані (мМО/мл) | Отримані (мМО/мл) |
|------------------|--------------------|-------------------|
| S2 нерозбавлений | — | 781.0 |
| 1:2 | 390.5 | 408.0 |
| 1:4 | 195.2 | 195.0 |
| 1:8 | 97.6 | 100 |
| 1:16 | 48.8 | 44.0 |

«Хук-ефект»

Кожного разу, коли зразки з дуже високими концентраціями антигена аналізуються нерозбавленими в поетапному "сендвіч"- методі, як в цьому наборі, «хук-ефект» може дати значення концентрацій очевидно нижчі, ніж фактичні значення. В цьому наборі на спостерігається «хук-ефект» в концентрації до 90,000 мМО/мл.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Результати аналізу повинні ретельно інтерпретуватись і бути підтверджені клінічними оцінками і подальшими діагностичними тестами.

Інформація для замовлення:

ПМП "ДІАМЕБ",
 Вул. Чорвола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
 Тел.: (0342) 775 122; Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.com

