



Набір для визначення ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНУ

HPL ELISA KIT

Кат. № : 102-1283
Кількість : 96
Виробник : DRG (USA)

*Методика: версія 2.0
від січня 2000*

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ.

Фізіологічна роль людського Плацентарного лактогену (ЛПЛ) до кінця не встановлена, проте, значна подібність з гормоном росту людини привела до появи гіпотези про функцію регулятора фетоплацентарного росту і інших змін під час вагітності. Було запропоновано, що рівні ЛПЛ в сироватці матері можуть відображати "індекс плацентарної функції".

Зменшення рівнів ЛПЛ асоціюються зі смертю в матці, пригніченням та асфіксією плода під час родів. Цей зв'язок особливо сильний, якщо повторно виявляють зменшення рівнів ЛПЛ, що проявляється хронічною плацентарною, а значить і фетальною недостатністю. Зменшення концентрації ЛПЛ звичайно не спостерігається, якщо вагітність протікає без ускладнень.

Підвищені рівні ЛПЛ вказуються звичайно на благоприємний перебіг родів у вагітних з одним плодом. Тим не менше, високі рівні ЛПЛ можуть говорити про специфічну патологію плода, таку як цукровий діабет, макросомія плода, резус-імунізація і водянка.

ПРИНЦИП ТЕСТУ.

Набір є соліднофазним ферментнозв'язаним імуносорбційним набором, створеним по принципу "сандвіча". Лунки на мікропланшетці покриті моноклональним антитілом проти антигену на молекулі ЛПЛ. Зразок сироватки пацієнта з ендогенним ЛПЛ інкубується у лунці разом з ензимним кон'югатом (анти-ЛПЛ-сироватка, кон'югована з пероксидазою хрому). Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається водою. Кількість зв'язаної пероксидази прямо пропорційна концентрації ЛПЛ в зразку. Після додавання субстрату інтенсивність утворюваного забарвлення пропорційна концентрації ЛПЛ в зразку пацієнта.

РЕАГЕНТИ.

- Мікропланшетка з лунками:** 1шт., 96 лунок, покритих анти-ЛПЛ-моноклональним антитілом.
- Ензимний кон'югат,** 11 мл. Анти-ЛПЛ-сироватка, кон'югована з пероксидазою хрому.
- Розчин Субстрату** - TMB, 11 мл.
- Стоп-розчин** 0,5 М H₂SO₄, 6 мл.

- Набір стандартів:** 0,5 мл у флаконі, з концентраціями 1,25; 5; 10; 20 мг/л.
- Нульовий стандарт або Розчинник** зразків, 90 мл.

ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ.

При зберіганні при температурі 2-8°C активність невідкритих реагентів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати.

Ензимний кон'югат, розчин Субстрату, Стандарти і Нульовий стандарт повинні зберігатись при 2-8°C.

Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8°C. Після відкриття ящика треба знову тісно його запечатати. Імунореактивність лунок стабільна приблизно 6 тижнів після відкриття, але тісного запечатання з десікатором.

НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ.

Термін вагітності, тиж.	Вагітність одним плодом	Вагітність двійнятами
10-12	0,05-1,0 мг/л	
12-14	0,10-1,7 мг/л	
14-16	0,3-2,8 мг/л	
16-18	0,5-3,5 мг/л	
18-20	0,9-4,0 мг/л	
20-22	1,1-5,0 мг/л	2,2-7,0 мг/л
22-24	1,3-5,8 мг/л	3,0-8,1 мг/л
24-26	1,6-6,7 мг/л	3,6-9,2 мг/л
26-28	2,0-7,7 мг/л	4,1-10,3 мг/л
28-30	2,7-8,5 мг/л	4,6-11,7 мг/л
30-32	3,2-9,5 мг/л	5,0-13,0 мг/л
32-34	3,7-10,1 мг/л	5,4-15,1 мг/л
34-36	4,0-10,7 мг/л	5,7-17,8 мг/л
36-38	4,3-11,2 мг/л	5,9-19,7 мг/л
38-40	4,4-11,7 мг/л	5,8-19,6 мг/л
40-42	4,3-11,6 мг/л	-

МАТЕРІАЛИ ПОТРІБНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ.

- Фотометр (450 нм±10 нм).
- Мікропіпетки зі змінними насадками 10, 50, 100 і 1000 мкл.
- Звичайний холодильник.
- Пробірки для змішування (1 на зразок) (непокриті стандартні пробірки 12 x 75 мм).
- Вортекс чи еквівалент.
- Абсорбуючий папір.

ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ.

- 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.
- Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
- Негайно після використання закривайте флакони з реагентами.
- Не використовуйте такі розчини, як азид натрію.
- Не піпетуйте реагенти ротом.
- Тільки для діагностичного використання "in vitro".
- Не змішуйте реагенти різних наборів.

ЗБИРАННЯ І ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ.

- Збирайте кров, пунктуючи вену; дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Уникайте гемолізу.

УВАГА! Цей набір тільки для роботи із сироваткою без домішок.

- Зразки повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8⁰С 5 днів. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до – 20⁰С. Після відтаювання зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ.**ЗАГАЛЬНІ ЗАУВАЖЕННЯ.**

- Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакових інтервали часу.
- Цей набір дає максимальну абсорбцію від 1,200 до 2,000 в межах 10 хвилин при кімнатній температурі (22⁰С). Якщо абсорбція виходить вище чи нижче, ви можете зменшити або подовжити час інкубації кінцевої ферментативної реакції формування забарвлення відповідно до потреб. За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації. Це робить можливим інтерполяцію для фіксованих фізико-хімічних умов.

ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ.

Перед початком тесту зразки треба розвести Нульовим стандартом 1:100:

- Додайте для кожного зразка, що буде вимірюватись, в одну тестову пробірку 1 мл Нульового стандарту;
- Додайте 10 мкл кожного зразка у відповідні пробірки. Помішайте всі пробірки на вортексі без утворення піни 10 секунд.

Примітки:

- Ручне піпетування: рекомендується не використовувати більше як 32 лунки в кожному тесті. Піпетування всіх стандартів, зразків і контролів повинно бути закінчено за 3 хвилини.
- Автоматичне піпетування: в кожному тесті можна використовувати повну планшетку з 96 лунок. Проте, піпетування всіх стандартів, зразків і контролів повинно бути закінчено за 3 хвилини.
- Всі стандарти, зразки і контролі повинні тестуватись одночасно в дублі, щоб умови були однакові.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ.

- Відділіть необхідну кількість лунок;
- Додайте в кожну лунку **100 мкл** анти-лПЛ-ензимного кон'югату;

- Додайте **10 мкл** лПЛ-Стандартів (0, 1,25, 5, 10, 20 мг/мл), Контролів і розведених сироваткових зразків (**кожний раз з новою насадкою**) у відповідні лунки;
- Добре змішайте **10 секунд**. Важливо досягнути повного змішування на даному етапі;
- Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі;
- Різно вилийте вміст лунок;
- Промийте лунки **5 разів** дистильованою водою;
- Промокніть лунки на промокальному папері, щоб видалити залишки;
- Додайте **100 мкл** Субстрату в кожну лунку;
- Інкубуйте **10 хвилин** при кімнатній температурі;
- Зупиніть реакцію додаванням в кожну лунку **50 мкл** стоп-розчину;
- Зчитайте дані на фотометрі при **450±10 нм**.

Кінцева стабільність реакції.

Важливо, щоб дані лунок зчитувались в межах 10 хвилин після 11 кроку.

ВИРАХУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі в мг/л.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначіть відповідну концентрацію лПЛ зі стандартної кривої. Опрацювання даних може проводитись і іншими методами, в залежності від досвіду.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОВЕДЕННЯ.**1. СПЕЦИФІЧНІСТЬ:**

	Антигени	Еквівалент до лПЛ
ХГ	2000 МО/л	не визначено
АФП	300 КМО/л	не визначено
СТГ	100 мкг/л	не визначено
Пролактин	200 мкг/л	не визначено

2. ЧУТЛИВІСТЬ.

Мінімальний визначений рівень лПЛ складає 0,3 мг/л.

3. ТОЧНІСТЬ.**а. Внутрітестова точність.**

Внутрітестова точність була визначена визначеннями концентрацій в 3 різних сироватках.

Зразок сироватки	1	2	3
Кількість реплікантів	18	18	18
Середнє лПЛ (мг/л)	0,66	2,34	6,24
Стандартне відхилення	0,04	0,13	0,42
Коефіцієнт варіації (%)	6,06	5,55	6,73

б. Міжтестова точність.

Міжтестова точність була визначена визначеннями концентрацій 3 різних сироваток різними наборами.

Зразок сироватки	1	2	3
Кількість реплікантів	39	24	24
Середнє лПЛ (мг/л)	0,68	2,52	6,87
Стандартне відхилення	0,06	0,18	0,39

Коефіцієнт варіації (%) 8,82 7,14 5,67

4. ВІДТВОРЕННЯ І РОЗВЕДЕННЯ.

а. Відтворюваність.

Різні зразки сироватки з відомими концентраціями були змішані і протестовані в дублікаті. Середня відтворюваність була 101,17 %.

Очікувана кон- центрація, мг/л	Виявлена кон- центрація, мг/л	Відтворюваність %
1,51	1,43	94,7
2,60	2,81	108,0
3,38	3,17	93,8
3,97	3,97	100,0
5,84	6,13	105,0
6,76	7,13	105,5

б. Розведення.

Зразки 2 пацієнтів були лінійно розведені Нульовим стандартом. Середня відтворюваність 99,7 %.

Пацієнти	Розведення	Очікувана концентрація, мг/л	Виявлена концент-ція, мг/л	Відтворюваність %
1	1:50		14,16	
	1:100	7,08	6,69	94,5
	1:200	3,54	3,52	99,4
	1:400	1,77	1,78	100,6
	1:800	0,88	0,99	112,5
2	1:50		15,97	
	1:100	7,98	6,42	80,5
	1:200	3,99	4,04	101,3
	1:400	1,99	1,99	100,0
	1:800	0,99	1,08	109,1

5. ПОБІЧНИЙ ЕФЕКТ.

Не було виявлено побічних ефектів цього набору аж до 700 мг/л лПЛ.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ.

Лабораторна практика показує, що необхідно, щоб контролі тестувались для кожної калібраційної кривої. Для встановлення середніх значень і допустимих коливань необхідно протестувати статистично достовірну кількість контролів. Не використовуйте контролі, в яких міститься азид натрію.

ОБМЕЖЕННЯ ДО ПРОЦЕДУРИ.

1. Надійні результати будуть отримані тоді, коли тестування проводиться з повним розумінням інструкції.
2. Результати, отримані з допомогою цього набору повинні використовуватись як допоміжні до інших діагностичних процедур і джерел інформації, доступних лікарю.
3. Промивання - критичний етап. Недостатнє промивання дасть погані результати і завищену абсорбцію.

Інформація для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 77 51 22
тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.com