



## Набор ИФА для определения свободной бета- субъединицы хорионического гонадотропина человека

Кат. № : 4221Z  
Количество тестов : 96  
Производитель : DAI (США)

Методика от 10-10-2009

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Анализ	Free Beta HCG
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой ИФА
Диапазон обнаружения	0-50 МЕ/мл
Образец	20 мкл сыворотки
Специфичность	100 %
Чувствительность	0,5 мМЕ/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12-14 мес.

### НАЗНАЧЕНИЕ

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

### ВВЕДЕНИЕ

Человеческий хорионический гонадотропин (hCG) является гликопротеином, что нормально вырабатывается плацентой во время беременности. Гормон присутствует в крови и мочи в период 7-13 дней после имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Структурно интактная hCG молекула состоит из двух не-ковалентно связанных полипептидных субъединиц, альфа и бета цепи субъединиц. Измерение интактного hCG и альфа субъединицы hCG дает одинаковые результаты в крови и мочи, но не уровень бета субъединицы. В норме у материнской сыворотки второго – третьего триместра уровень интактного hCG составляет 20000 – 50000 мМЕ/мл. В контрасте, уровень или свободного  $\beta$ - или свободного  $\beta$ -hCG составляет в среднем половину 1% уровня hCG. HCG и свободная субъединица не используется как маркер нефробластической опухоли, однако абсолютное увеличение  $\beta$ -hCG уровня в пациентов с хориокарциномой четко отличает его от нормальной беременности.

Недавние изучения показали значительное увеличение уровня свободного  $\beta$ -hCG субъединицы при трисоме 21, в случаях сравнения с контролями. Отсюда, предполагается, что анализ свободной  $\beta$ -hCG субъединицы вместе с АФП материнской сыворотки может быть эффективным при скрининге протокола для трисомы 21.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор является твердо фазовой энзимно-связанным иммунсорбентным набором. В анализе используется одно анти- $\beta$ -hCG антитело для иммобилизации твердой фазы (микротитрационные лунки) и мышинное моноклональное анти- $\beta$ -hCG антитело в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгата. Тестовый образец (сыворотка) добавляется к  $\beta$ -hCG антителу, привитому к микрочайкам, и инкубируется с нулевым буфером. Если  $\beta$ -hCG присутствует в образце, он связывается с антителом на ячейках. Потом лунки промываются для удаления оставшегося тестового образца, и добавляется  $\beta$ -hCG антитело, меченное пероксидазой хрена (конъюгат). Конъюгат связывается иммунологически с  $\beta$ -hCG на ячейках, в результате чего молекулы  $\beta$ -hCG будут в сандвиче 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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, 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 5 раз промывочным буфером (1x), 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 полной 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.

**ОГРАНИЧЕНИЕ 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 мМЕ/мл  $\beta$ -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  $\beta$ -hCG в мМЕ/мл.

**ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ**

Результаты получают со считыванием оптической плотности при 450 нм на оси Y по отношению к концентрациям  $\beta$ -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.

$\beta$ -hCG (мМЕ/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 указатели для количественного анализа свободного  $\beta$ -hCG**

1. На ранних сроках беременности концентрация свободного  $\beta$ -hCG обнаружена 10-80 мМЕ/мл. Коэффициент свободного  $\beta$ -hCG / интактного hCG равен 3,08 – 3,28%. После 6-7 недели свободный  $\beta$ -hCG и соотношение исчезают. Во время второго и третьего триместра стабильный коэффициент наблюдался в 1%.
2. Сыворотка образцов 40 нормальных субъектов тестировалась, в этой популяции в 99% значение было меньше, чем 0,4 мМЕ/мл.

Сыворотка hCG и уровень свободной субъединицы в сыворотке с хориокарциномой в период беременности показано ниже:

№ пациента	hCG (мМЕ/мл)	$\alpha$ -hCG (мМЕ/мл)	$\beta$ -hCG (мМЕ/мл)
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****1. Точность****Внутри тестовая**

	Репликаны	Среднее	СО	КВ, %
Уровень I	16	4,22	0,09	2,23
Уровень II	16	8,54	0,21	2,49
Уровень III	16	20,16	1,23	6,09

**Между тестовая**

	Репликаны	Среднее	СО	КВ, %
Уровень I	16	4,36	0,29	6,70
Уровень II	16	9,22	0,65	7,10
Уровень III	16	20,05	1,42	7,10

**2. Линейность**

Сыворотка двух пациентов была серийно разбавлена разбавителем образцов при изучении линейности. Среднее восстановление равно 103,4%.

Образец А			
Разбавление	Ожидаемый	Считанный	% восстан.
Неразбавл.	26,1	26,1	
X2	13,1	12,9	98,7
X4	6,5	5,9	90,8
X8	3,3	3,1	93,6
X16	1,6	1,8	113,0
Среднее:			99,0
Образец В			
Разбавление	Ожидаемый	Считанный	% восстан.
Неразбавл.	36,6	36,6	
X2	18,3	21,3	116,3
X4	9,2	9,3	101,8
X8	4,6	4,4	96,0
X16	2,3	2,4	103,4
Среднее:			104,4

**3. Восстановление**

Разные образцы сывороток пациентов с известным  $\beta$ -hCG были перемешаны и проанализированы в дубликате. Среднее восстановление равно 99,95%.

Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	% восстановления
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%		

**4. Чувствительность**

Минимально определяемая концентрация этого анализа установлена 0,5 мМЕ/мл.

**5. Перекрестная реактивность**

Следующие человеческие материалы тестировались на перекрестную реактивность:

Антигены	Концентрация	Эквивалент hCG, мМЕ/мл	% перекрестн. реактив-ти
TSH	1000 мкМЕ/мл	0,0	0,00
FSH	5000 мМЕ/мл	0,0	0,00
Пролактин	1000 нг/мл	0,68	0,07
LH	1000 мМЕ/мл	4,88	0,49
$\alpha$ -hCG	5000 нг/мл	1,25	0,03
Интактная hCG	1000 мМЕ/мл	7,24	0,72

**6. «Хук-эффект»**

Хук-эффекта в данном анализе не наблюдалось.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

ЧМП «ДИАМЕБ»  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: info@diameb.ua  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)