



Набор для количественного определения β -ХГЧ в человеческой сыворотке

Кат. Номер : E-HCG-2P
Количество : 96

Методика от 07-2007

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

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- Длина волны - фильтр измерения: 450 нм
- Время инкубации - 92 минуты при 37°C (20/60/12)
- Ферментный конъюгат - HRP (Пероксидаза Хрена)
- Субстрат - ТМВ (3,3,5,5 - Tetramethyl-benzidine)
- Образец - Сыворотка или Плазма

Стабильность образцов - неразбавленных: 2 дня при 2-8°C; для более длительного хранения при -20 °C

- Диапазон калибровки - 0 – 200 мМЕ/мл
- Чувствительность - 1.0 мМЕ/мл
- Время годности и стабильность компонентов набора:

Набор: 12 месяцев от даты изготовления.

Компоненты набора: посмотрите дату истечения срока на ярлыке.

Концентрат промывочного буфера: стабилен в течении 30 дней после разбавления.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. Микропланшет, 12x8 (разделенных) полосок; 96 лунок, покрытых анти-моноклональным бета-ХГЧ,
2. Калибраторы (5), 5 флаконов по 0,4 (0,2) мл. Концентрации: 0; 5; 20; 75 и 200 мМЕ/мл. Готовы к использованию.
3. Разбавитель Образца, 1 флакон, 10 (5) мл.
4. Ферментный конъюгат, 1 флакон 12 (6) мл анти-бета-ХГЧ конъюгата с пероксидазой хрена. Готов к использованию.
5. Раствор Субстрата, 1 флакон ТМВ-субстрата, 12 (6) мл. Готов к использованию.
6. Стоп Раствор, 1 флакон серной кислоты 0,25 моль/л, 12 (6) мл. Готов к использованию.
7. Промывочный буфер, 1 флакон, 25 (12,5) мл, 40x концентрат.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Неионизированная или дистиллированная вода.
2. Объемные пробирки и подставки.
3. Подставки для промывки
4. Микропипетки от 25 до 1000 мкл.
5. Многоканальная пипетка.
6. Этаповый координатный стол.
7. Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при (450 нм \pm 10 нм). Если доступен фотометр с двойной длиной волны, контрольный фильтр нужно установить на 600-690 нм.
8. Автоматический микропланшетный вошер, способный к распределению 200-300 мкл.

ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

β -ХГЧ ELISA анализ основан на одновременном связывании человеческого β -ХГЧ с двумя моноклональными антителами, одним, иммобилизированным на микролуноках планшета, другим, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP).

После инкубации связанное/свободное отделение проводится простой промывкой твердой фазы, затем добавляется раствор субстрата (ТМВ). После того, как прошло соответствующее время для максимального развития цвета, ферментная реакция останавливается и определяется абсорбция.

β -ХГЧ концентрация в образце вычисляется исходя из ряда стандартов. Интенсивность цвета пропорциональна концентрации β -ХГЧ в образце.

ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА

Данный ELISA анализ – непрямой твердофазный иммуноанализ, основанный на принципе сэндвича.

Микролуночки покрыты анти-моноклональным β -ХГЧ, с последовательным блокированием неактивных краев, чтобы сократить неспецифическое связывание.

Этап 1 β -ХГЧ антигены, присутствующие в калибраторах и образцах пациентов привязываются к покрытому антителу.

Этап 2 Комплекс антиген-антитело вступает в реакцию с ферментом (HRP), меченным анти-моноклональным β -ХГЧ конъюгатом, который ведет к разделению β -ХГЧ между антителом твердой фазы и ферментным конъюгатом.

Этап 3 Фермент преобразовывает добавленный субстрат (ТМВ), создавая цветной раствор.

Этап 4 Интенсивность изменения цвета, которое пропорционально концентрации антител в образцах считывается микропланшетным фотометром при 450 нм. Результаты выражены в мМЕ/мл.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна установить свои собственные стандартные диапазоны, основанные на пациентах.

Значения β -ХГЧ сыворотки или плазмы определены в следующих диапазонах:

Образец	Диапазон мМЕ/мл
не беременная женщина	< 8.0 мМЕ/мл
Беременность	
1-3-я неделя	0 - 50 мМЕ/мл
4-я неделя	0 - 400 мМЕ/мл
5-я неделя	280 - 19400 мМЕ/мл
6-я неделя	2030 - 49700 мМЕ/мл
2-й месяц	18900 - 133400 мМЕ/мл
3-й месяц	25530 - 229600 мМЕ/мл

РЕАГЕНТЫ

Хранение

- Хранить все реагенты при 2° - 8°C. Не замораживать!

Подготовка

- Покрытые микролуночные полоски только для одноразового использования.
- Калибраторы, раствор субстрата, ферментный конъюгат и стоп раствор готовы к использованию и не нуждаются в разбавлении.
- Промывочный буфер концентрированный и требует разбавления.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

1. ВНИМАНИЕ: Не существует методов тестирований, на 100% гарантирующих отсутствие компонентов вируса Гепатита Б, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV), или других инфекций. Поэтому все продукты, содержащие компоненты человеческой крови должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Поэтому при работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности, установленные в лабораторной практике.
2. Избегайте контакта кожи со Стоп-раствором. Это может вызвать раздражения и ожоги.
3. Немедленно после использования закройте реагенты крышками. Не путайте крышки от реагентов.
4. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид соды, не должны использоваться в ферментной реакции.
5. Только для диагностики ин-витро.
6. Не используйте в исследовании компоненты из наборов разных партий.

ЗАБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. В данной процедуре использовать только образцы сыворотки или плазмы. Нет необходимости для пациентов удерживаться от еды и не требуется специальное приготовление.
2. Забрать кровь венепункцией, дождаться свертывания и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Избегайте гемолиза.
3. Образцы необходимо хранить максимум до 2 дней при 2-8°C. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить до -20°C до исследования. Образцы с концентрацией более 200 мМЕ/мл необходимо разбавить разбавителем образца.

ПРОЦЕДУРА

Процедурные замечания

1. Перед исследованием все реагенты и образцы должны иметь комнатную температуру. Все реагенты перемешивать без образования пены.
2. После начала теста все этапы должны быть завершены без перерывов.
3. Для каждой пробы использовать новые одноразовые наконечники пипеток.
4. Абсорбция исходит из времени инкубации и температуры. До начала исследования рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить требуемое количество лунок, и т.д., чтобы пройти все этапы исследования без остановки.

Подготовка реагентов
Промывочный буфер

Добавьте 25 мл промывочного буфера к 975 мл дистиллированной воды.

Подготовка образца

Обычно нет необходимости в разбавлении; разбавьте образцы с концентрациями выше 200 мМЕ/мл разбавителем образца.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Используйте протокол размещения образцов в лунках (см. Рисунок ниже), где используются **5 калибраторов** (стандартов) (А-Е) и **1 бланк**. Пользователь может провести на выбор анализ в паре:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	Blank	D	P3									
b	A	E	P4									
c	A	E	P4									
d	B	P1	P..									
e	B	P1	P..									
f	C	P2										
g	C	P2										
h	D	P3										

Кал	Конц.
.	мМЕ/мл
A	0
B	5
C	20
D	75
E	200

1. Возьмите требуемые лунки из сумки и верните неиспользованные полоски в запечатанную сумку в холодильнике. Безопасно разместите микролунки в дополнительном держателе.
2. Пипеткой внесите по **25 мкл калибратора и образца** в лунки.
3. Накройте планшет и инкубируйте **20 минут при 37°C**.
4. Добавьте **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку планшета кроме бланка, накройте планшет и инкубируйте **60 минут при 37°C**.
5. Удалите содержимое микролунок и промойте их **200-300 мкл** промывочного буфера. Повторите процедуру **4 раза**.
6. Внесите **100 мкл раствора субстрата** в каждую микролунку в том же порядке и времени как для ферментного конъюгата и бланка.
7. Инкубируйте **12 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **100 мкл стоп раствора** в каждую микролунку, в том же порядке и времени как для раствора субстрата.
9. Используя микропланшетный фотометр, считайте абсорбцию каждой микролунки при **450 нм относительно бланка**.

ОЦЕНКА АНАЛИЗА

Средняя абсорбция и процентное соотношение.

1. Вычислите средние показатели абсорбции (Em), соответствующие единичным точкам стандартной кривой и показатели каждого образца.
2. Отнимите значение средней абсорбции нулевого стандарта от значений средней абсорбции стандартов и образцов.
3. Нарисуйте стандартную кривую на графопостроительной бумаге выводя значения абсорбции стандарта против соответствующей концентрации β-ХГЧ.
4. Считайте концентрации β-ХГЧ калибраторов и образцов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Анализ не должен проводиться с высокогемолизированными, биологически загрязненными или липемическими образцами. Этот метод нужно использовать для анализа образцов только человеческой сыворотки.

Чувствительность

Чувствительность

Минимально определенная концентрация β-ХГЧ в данном анализе составляет 1,0 мМЕ/мл.

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность:

β - hCG	100.0 %
α - HCG	0.3 %
hLH	0.01 %
hFSH	0.01 %
hTSH	0.01 %

Точность

Внутри тестовая точность

Образец	1	2	3
Количество копий	7	7	7
Средняя β-ХГЧ (мМЕ/мл)	161	57	24,5
Стандартное отклонение	7	2,5	1,2
Коэффициент вариации (%)	4,35	4,03	4,72

Между тестовая точность

Образец	1	2	3
Количество копий	16	16	16
Средняя β-ХГЧ (мМЕ/мл)	1,4	28,4	65,4

Стандартное отклонение	0,08	1,75	2,83
Коэффициент вариации (%)	5,7	6,16	4,32

Восстановление

Среднее восстановление составило 99,5 % по соотношению к первичным концентрациям.

Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
18,8	18,4	97,8
41,4	43,3	104,5
76,8	73,2	95,3

Линейность

В линейном исследовании были последовательно разбавлены два образца пациентов. Среднее восстановление составило 102,7%.

Пациент	Ожидаемая концентрация	Полученная концентрация	Восстановление
1		62,8	
Разбавл. 1 / 2	31,4	33,1	105,4
Разбавл. 1 / 4	15,7	16,1	102,5
Разбавл. 1 / 8	7,8	8,4	107,6
2		12,8	
Разбавл. 1 / 2	6,4	6,5	101,6
Разбавл. 1 / 4	3,2	3,0	93,7
Разбавл. 1 / 8	1,6	1,7	106,1

Ограничения процедуры

В данном анализе не наблюдается эффект «крюка» до 10.000 мМЕ/мл β - ХГЧ.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97 г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 775122 тел/факс: (0342) 775612
e-mail: info@diameb.com