

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ β -ХГЛ (ХОРИОНІЧНИЙ ГОНАДОТРОПІН ЛЮДИНИ) В СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ ЛЮДИНИ

Z03320, β -hCG

Каталог. №: Z03320

Кількість: 96

Виробник: **Dialab (Австрія)**

Методика від 11-2014

Версія 06



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладаєної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

Для використання в In-Vitro діагностиці

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

- Довжина хвили**
Фільтр вимірювання: 450 нм
Фільтр контролю: 620-630 нм
- Інкубаційний час**
75 хвилин при кімнатній температурі (60/15)
- Ферментний Кон'югат**
HRP (Пероксидаза Хрону)
- Субстрат**
ТМВ (3,3', 5,5'-Тетраметил-бензидин)
- Зразок**
Сироватка або плазма
- Діапазон калібрування**
0 - 400 мМОд/мл
- Чутливість**
0.09 мМОд/мл
- Термін придатності та стабільність компонентів набору**
Набір: 15 місяців з дня виготовлення
Склад набору: Див. термін придатності на етикетці

1. РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЙ

1.1 Реагенти та матеріали, що поставляються в наборі

Калібратори (C_A-C_B-C_C-C_D-C_E-C_F): Калібратори β -ХГЛ 6 x 1 мл

	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E	C _F
мМОд/мл	0	1	5	20	100	400

Контроль β -ХГЛ: 1 x 1 мл, концентрація є специфічною для лоту, вказана на етикетці флакона/сертифікаті аналізу

Кон'югат Розчинника: 1 x 50 мл фосфатний буфер 50 мМ рН 7,4; БСА 1 г/л

Ферментний кон'югат: 1 x 1,0 мл/флакон субодиниця анти- α -ХГЛ, кон'югована з пероксидазою хрону (HRP)

Мікропланшет: 12x8 смужок, моноклональні антитіла, спрямовані проти субодиниць β -ХГЛ, адсорбовані на мікропланшет

Розчин Субстрату: 1 x 15 мл/флакон H₂O₂-ТМВ 0,26 г/л (уникати будь-якого контакту зі шкірою)

Стоп-Розчин: 1 x 15 мл/флакон сірчаної кислоти 0,15 моль/л (уникати будь-якого контакту зі шкірою)

Промивний Буфер: 50x концентрат, 1 x 20 мл NaCl, 45 г/л; Твін-20 55 г/л

1.2 Необхідні реагенти, які не поставляються в наборі

- Дистильована вода

1.3 Допоміжні матеріали і прилади

- Автоматичний дозатор
- Мікропланшетний рідер (450 нм, 620-630 нм)

1.4 Примітки

Зберігати всі реагенти при температурі 2-8 °C в темряві.

Відкрийте пакет з Мікропланшетом з нанесеним покриттям тільки тоді, коли він буде при кімнатній температурі і запечатайте відразу після використання. Після відкриття він зберігає стабільність до закінчення терміну придатності набору.

Не знімайте захисну плівку з невикористаних смужок.

2. КЛІНІЧНА ЗНАЧИМІСТЬ

Хоріонічний гонадотропін людини (ХГЛ) являє собою гормон глікопротеїну, що виробляється під час вагітності ембрионом незабаром після зачаття, а потім за допомогою синцитіального трофобласту (частина плаценти). Його роль полягає в запобіганні розпаду жовтого тіла яєчника і тим самим підтримується виробництво прогестерону, що має вирішальне значення для вагітності у людей. ХГЛ може мати додаткові функції, наприклад, вважається, що він впливає на імунну толерантність вагітності.

Тести на вагітність вимірюють рівень ХГЛ в крові або сечі, щоб вказати попередньо присутність або відсутність імплантованого ембріона. Зокрема, тести на вагітність використовують антитіла, специфічні до бета-субодиниці ХГЛ (β -ХГЛ). Це дуже важливо, тому що тести не дають помилкових позитивних результатів, плутаючи ХГЛ з ЛГ і ФСГ.

β -ХГЛ також секретується деякими видами раку, включаючи тератоми, хоріокарциноми. Але, підвищені рівні не можуть довести наявності пухлини, а також низький рівень не виключає її.

3. ПРИНЦИП ДІЇ

β -ХГЛ ІФА заснований на одночасному захопленні ХГЛ моноклональним антитілом, іммобілізованим на мікропланшеті і спрямованим проти фракції β -ХГЛ і іншого моноклонального антитіла, кон'югованого з пероксидазою хрону (HRP) і спрямованого проти субодиниці α -ХГЛ. Після інкубації відбувається пов'язаний/вільний поділ за допомогою простого твердофазного промивання. Ферментний HRP у пов'язаній фракції вступає в реакцію з субстратом (H₂O₂) і субстратом ТМВ, що призводить до розвитку синього кольору, який змінюється на жовтий при додаванні стоп-розчину (H₂SO₄).

Концентрація β -ХГЛ в зразку обчислюється на основі серії стандарту. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації β -ХГЛ в зразку.

4. ЗАУВАЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для in vitro використання тільки професійним персоналом. Не для внутрішнього або зовнішнього застосування на людях або тваринах.
- Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту при роботі з реагентами, які постачаються.
- Дотримуйтесь належної лабораторної практики (GLP) для обробки продуктів крові.
- Деякі реагенти містять невелику кількість Proclin³⁰⁰ в якості консерванту. Уникайте контакту зі шкірою або слизовою оболонкою.
- Субстрат ТМВ містить подразник, який може завдати шкоди при вдиханні, ковтанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб уникнути травм, не вдихати, не ковтати і не контактувати зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною і корозійною і може бути токсичною, якщо її проковтнути. Щоб уникнути хімічних опіків, уникати контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу на реагент ТМВ/H₂O₂ прямого сонячного світла, металів або оксидантів. Не заморожувати розчин.
- Цей метод дозволяє визначити β -ХГЛ від 1,0 до 400 мМОд/мл.
- Будь ласка, строго дотримуйтесь послідовності кроків піпетування, передбачених в даному протоколі. Дані про продуктивність, представлені тут, були отримані з використанням специфічних реагентів, перелічених у цій інструкції по застосуванню.
- Всі реагенти повинні зберігатися в холодильнику при температурі 2-8 °C в оригінальній упаковці. Будь-які винятки чітко вказані. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при зберіганні та поводженні, як зазначено.
- Дозволити всім компонентам набору і зразкам досягти кімнатної температури (22-28 °C) і добре перемішати перед застосуванням.
- Не замінюйте компоненти набору з різних партій. Терміни придатності, зазначені на етикетках коробки і флаконів, повинні бути дотримані. Не слід використовувати будь-який компонент набору після закінчення терміну його дії.
- При використанні автоматизованого обладнання переконайтеся, що набір був належним чином перевірений. Для підвищення продуктивності набору на автоматичних системах ІФА рекомендується збільшити кількість промивок.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу і/або збільшення фону.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно перевищувати десять хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтесь того ж порядку піпетування. Якщо використовується більш ніж один планшет, рекомендується повторити криву залежності відповіді від дози для кожного планшета.

- Додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додавати в тій же послідовності, щоб виключити будь-яке відхилення часу під час реакції.
- Дотримуйтесь рекомендації для здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контролів і/або об'єднаних сироваток.
- Максимальна точність необхідна для відновлення і внесення реagentів.
- Мікробіологічно забруднені зразки не повинні використовуватися в аналізі. Так само як і високо ліпемічні або гемолізовані зразки.
- Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкайтесь нижньої частини лунки.

5. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

5.1 Підготовка калібраторів (C_A-C_F)

Калібратори, калібровані проти 1-го IRP BOO3 75/537, мають приблизно наступну концентрацію:

	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E	C _F
мМОд/мл	0	1	5	20	100	400

Калібратори стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

Після відкриття, калібратори стабільні протягом шести місяців при температурі 2-8 °С.

5.2 Приготування розчину Промивного Буфера

Розвести вміст кожного флакона концентрату буферного розчину для промивання (50x) з дистильованою водою до кінцевого об'єму 1000 мл перед використанням. Для невеликих обсягів дотримуватися співвідношення 1:50 для розведення. Розведений розчин для промивання стабільний протягом 30 днів при температурі 2-8 °С.

5.3 Підготовка Кон'югата

Готують безпосередньо перед використанням.

Додають 10 мкл кон'югату до 1 мл буфера Кон'югату. Кількість розведеного кон'югата пропорційна кількості випробувань. Обережно перемішати протягом 10 хвилин за допомогою обертового змішувача. Стабільний протягом 3 годин при кімнатній температурі (22-28 °С).

5.4 Підготовка зразка

Визначення β-ХГЛ повинно проводитись в сироватці або плазмі людини. Зразки можна зберігати при температурі 2-8 °С протягом короткого проміжку часу (максимально 2 дні). Для більш тривалого зберігання зразки слід заморозити. Уникайте повторного заморожування і відтавання.

Для зразків з концентрацією більше 400 мМОд/мл розбавити зразок буфером Кон'югату. Контроль готовий до використання.

5.5 Процедура

- Привести всі реагенти до кімнатної температури (22-28 °С) протягом принаймні 30 хвилин. В кінці аналізу відправити реагенти негайно для зберігання при температурі 2-8 °С, щоб уникнути тривалого впливу кімнатної температури.
- Невикористані смужки повернути в пакет з фольги, що містить осушувач і зберігати при температурі 2-8 °С.
- Щоб уникнути мікробного і/або хімічного забруднення, залишки невикористаних реагентів ніколи не виливати назад в оригінальні флакони.
- Так як необхідно виконувати визначення в двох примірниках, підготувати дві лунки для кожної з шести точок калібральної кривої (C_A-C_F), дві для кожного зразка, дві для Контролю, одну для Бланка.

Піпетувати:

	Калібратор	Зразок/Контроль	Бланк
Зразок/Контроль	-	25 мкл	-
Калібратори C _A -C _F	25 мкл	-	-
Розведений кон'югат	100 мкл	100 мкл	-

Інкубувати при КТ (22-28 °С) протягом 1 години.

Видалити вміст з кожної лунки; промити лунки 3 рази 300 мкл розведеного промивного буфера. При використанні автоматизованого обладнання, промити лунки як мінімум 5 разів.

Важливе зауваження: Під час кожної стадії промивання, обережно струсіть планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишки розчину, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому паперовому рушнику.

Автоматичний вошер: Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, промийте лунки як мінімум 5 разів.

Піпетувати:

	Калібратор	Зразок/Контроль	Бланк
Субстратний Розчин	100 мкл	100 мкл	100

Інкубувати при КТ (22-28 °С) протягом 15 хвилин в темряві.

Піпетувати:

	Калібратор	Зразок/Контроль	Бланк
Стоп Розчин	100 мкл	100 мкл	100

Потрясти мікропланшет обережно.

Виміряти оптичну щільність (E) при 450 нм проти еталонної довжини хвилі 620-630 нм або проти Бланку протягом 5 хвилин.

6. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі в діапазоні нормальних, високих і низьких рівнів β-ХГЧ для моніторингу характеристик аналізу. Ці контролі повинні розглядатися як невідомі і значення визначатись в кожній процедурі тесту. Графіки контролю якості повинні бути збережені для аналізу характеристик реагентів, які поставляються. Відповідні статистичні методи повинні бути використані для встановлення тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити межі аналізу. Крім того, максимальна оптична щільність повинна відповідати попередньому досвіду. Значне відхилення від звичайних показників вказує на непомічені зміни умов проведення аналізу або погіршення реагентів набору. Свіжі реагенти повинні бути використані для визначення причини варіації.

7. РЕЗУЛЬТАТИ

7.1 Середня абсорбція

Розраховують середнє значення оптичної щільності (E_m) для кожної точки калібральної кривої і кожного зразка.

7.2 Калібральна крива

Відкласти значення оптичної щільності калібраторів проти концентрації. Намалювати найбільш підходящу криву через відмічені точки (4-параметровий Logistic або Sigmoid).

7.3 Підрахунок результатів

Інтерполюйте значення зразків на калібральну криву для отримання відповідних значень концентрацій, виражених в мМОд/мл.

8. НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Кожна лабораторія повинна встановлювати свої власні нормальні діапазони на основі популяції пацієнтів.

Еталонними значеннями β-ХГЛ сироватки або плазми є:

Нормальні жінки: < 8.0 мМОд/мл

Вагітність:	1 ° тиждень	3,0 - 100 мМОд/мл
	2 ° тиждень	10 - 1000 мМОд/мл
	3 ° тиждень	100 - 10000 мМОд/мл
	4 ° тиждень	1000 - 100000 мМОд/мл
	2 ° місяць	15000 - 200,000 мМОд/мл
	3 ° місяць	10000 - 100000 мМОд/мл

Будь ласка, зверніть увагу на те, що визначення діапазону очікуваних значень для «нормального» населення в даному методі залежить від багатьох факторів, таких як специфічність і чутливість методу, який використовується, і типу населення, яке обстежується. Таким чином, кожна лабораторія повинна розглянути діапазон, заданий виробником, в якості загальної вказівки і визначити свій власний діапазон очікуваних значень на основі корінного населення, де лабораторія працює.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Точність

Точність в аналізі

Точність в аналізі визначали методом повторного аналізу (16x) двох різних контрольних сироваток в одному аналізі. В аналізі варіабельність становить ≤ 7,6%.

Точність між аналізами

Точність між аналізами визначали повторними аналізами трьох різних контрольних сироваток в різних партіях. Між аналізами варіабельність становить ≤ 8,8%.

9.2 Достовірність

Відновлення 6,25 - 12,5 - 25 - 50 мМОд/мл β-ХГЛ, доданого в зразок, дало середнє значення (± стандартне відхилення) 99,2% ± 4,1% по відношенню до вихідної концентрації.

9.3 Чутливість

Найменша концентрація β -ХГЛ, яка виявляється, і яку можна відрізнити від нульового калібратора, становить 0,09 мМОд/мл при 95% довірчому інтервалі.

9.4 Специфічність

Перехресна реактивність антитіла, розрахованого при 50% по Аврааму, наведена в таблиці:

h β -hCG	100.0 %
hFSH	3.0 %
hCG	4.0 %
hTSH	0.02 %

9.5 Кореляція з RIA

Набір Dialab β -ХГЛ ІФА порівнювали з іншим комерційно доступним аналізом β -ХГЛ. Зразки сироватки 49 жінок були проаналізовані відповідно в обох тестових системах.

Лінійна крива регресії була розрахована.

$$y = 0,94x - 0,02$$

$$r = 0,96 (R^2 = 0,92)$$

9.6 Хук Ефект

β -ХГЛ ІФА, конкурентний імуоферментний аналіз, не проявляє Хук Ефекту до 250000 мМОд/мл.

10. УПРАВЛІННЯ ВІДХОДАМИ

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих правил утилізації.



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

