

**Free β -HCG**
ЕНЗИМЕН ИМУНОЛОГИЧЕН ТЕСТ

ИН ВИТРО ЕНЗИМЕН ИМУНОЛОГИЧЕН ТЕСТ ЗА КОЛИЧЕСТВЕННО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА СВОБОДНАТА БЕТА ПОДЕДИНИЦА НА ЧОВЕШКИ ХОРИОН ГОНАДОТРОПИН (β -HCG) В СЕРУМ.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Концентрацията на β -HCG е право пропорционална на наситеността на получения при реакцията цвят на пробата. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично при 450 nm.

РЕАГЕНТИ

1. Anti- β -HCG coated microtiter plate, 96 wells
2. Zero Buffer, 13 ml
3. Enzyme Conjugate Reagent, 18 ml
4. HCG Reference Standards: 0, 2.5, 5, 10, 25 and 50 mIU/ml, лиофилизирани
5. TMB Reagent, 11 ml
6. Stop Solution (1N HCl), 11 ml.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Внимание: Този тест съдържа човешки материал. Източникът на този материал е тестван отрицателен за HbsAg, HIV1/2 и HCV, но никой наличен метод не може да гарантира напълно отсъствието им. Следователно третирайте всички кръвни продукти и проби като потенциално заразни. Спазвайте националните разпоредби за работа с биологично опасни материали.
2. Не използвайте реактивите след изтичане на срока на годност и не смесвайте компоненти от кутии с различен партиден номер.
3. Веднага поставйте капачките и не разменяйте капачките на различни шишенца.
4. Не пипетирайте с уста.
5. Избягвайте контакт с 1N HCl – може да причини дразнене или изгаряне на кожата. В случай на контакт измийте обилно с вода и потърсете лекарска помощ, ако дразненето продължи.
6. Само за ин витро диагностична употреба.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА ТЕСТА

Неотворените тестове трябва да се съхраняват при 2-8°C в затворената си опаковка с торбички поглъщащи влагата, за да се сведе до минимум излагането на влажен въздух. Отворените тестове остават стабилни до изтичане на срока на годност, ако се съхраняват както е описано по-горе. Тестовите могат да се използват на апарат с ширина на честотната лента 10 nm или по-малка, оптична плътност 0-2 OD или повече при 450 nm дължина на вълната.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Трябва да се използва серум, приготвен от пълна кръв, посредством стандартните лабораторни процедури. Тестът може да се използва само със серум, в който няма добавки. Отделете серума от коагулираните клетки до 60 минути от вземането на пробата. Не използвайте силно хемолизирани, липемични или мътни проби. Пробите могат да се съхраняват при 2-8°C до 24 часа. За по-дълги периоди на съхранение трябва да се замразят до -20°C. Проби, които са били замразени или са мътни трябва да се центрофугират преди да се тестват. Не замразявайте повторно пробите.

БЕЛЕЖКИ ПО ПРОЦЕДУРАТА

1. Пипетиране: Пипетирането на всички стандарти, проби и контроли трябва да се извърши в рамките на 3 минути.
2. Всички стандарти, проби и контроли, които се пускат в дублиращо измерване трябва да се пускат едновременно, за да са поставени при еднакви условия.
3. Препоръчва се всички ямки да бъдат отчетени до 15 минути след досбавянето на Stop Solution.

ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТИТЕ

1. Всички реагенти трябва да се поставят при стайна температура (18-25 °C) преди употреба.
2. Разтворете всеки лиофилизиран стандарт с 1.0 ml дестилирана вода. Изчакайте поне 20 минути след разтваряне на материала. Разбъркайте леко. Разтворените стандарти трябва да се съхраняват при 2-8°C и са стабилни 30 дни.

ПРОЦЕДУРА

1. Поставете желаните брой гнезда в носача.
2. Пипетирайте 50 μ l от стандартите, пробите и контролите в съответните гнезда.
3. Пипетирайте 100 μ l от Zero Buffer във всяко гнездо.
4. Размесете напълно в продължение на 30 секунди. Доброто размесване е особено важно в тази начална фаза.
5. Инкубирайте при 37°C 30 минути.

6. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с гнездата в контейнер за отпадъци.
7. Измийте гнездата с дестилирана или дейонизирана вода 5 пъти, като преди всеки следващ път изпразвате гнездата.
8. Изтупайте рязко гнездата върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки вода.
9. Пипетирайте 150 μ l от Enzyme Conjugate Reagent във всяко гнездо. Размесете леко в продължение на 5 секунди.
10. Инкубирайте при стайна температура 37 °C 30 минути.
11. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с гнездата в контейнер за отпадъци.
12. Измийте гнездата с дестилирана вода 5 пъти, като преди всеки следващ път изпразвате гнездата.
13. Изтупайте рязко гнездата върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки вода.
14. Пипетирайте 100 μ l от TMB във всяко гнездо. Леко разбъркайте 5 секунди.
15. Инкубирайте при стайна температура 20 минути.
16. Спрете реакцията като добавите 100 μ l Stop Solution във всяко гнездо.
17. Леко разбъркайте 30 секунди. Много е важно синият цвят напълно да се превърне в жълт.
18. Отчетете абсорбцията при 450 nm с ELISA апарат до 15 минути.

ИЗЧИСЛЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средната абсорбция (A_{450}) за всеки комплект стандарти, контроли и проби на пациенти.
2. Конструирайте стандартна крива въз основа на абсорбцията на всеки реферетен стандарт.
3. Използвайте средната стойност на абсорбцията за всяка проба, за да определите съответната концентрация на β -HCG в mIU/ml от стандартната крива.

ПРИМЕР ЗА СТАНДАРТНА КРИВА

Дадената като пример стандартна крива може да служи само като илюстрация и не трябва да се използва при изчисление на неизвестни проби. Всяка лаборатория трябва да получи свои собствени данни и стандартна крива.

β -HCG (ng/ml)	Абсорбция (450nm)
0	0.061
2.5	0.296
5.0	0.498
10.0	0.929
25.0	1.711
50.0	2.613

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

За пълнен HCG 1 ng е приблизително еквивалентен на 15 mIU. За свободна b-HCG, тъй като няма стандартизация на СЗО, направихме съпоставка между нашите тестове за HCG и free b-HCG и установихме, че 1 ng free b-HCG се равнява на 0.1 mIU HCG имунологична активност.

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ НА ТЕСТА

Минималната концентрация на HCG, която този тест може да открие, е 0.25 ng/ml.

Подробно описание на очакваните стойности е дадено в листовката на английски.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕСТА

1. Надеждни и възпроизводими резултати могат да се постигнат само ако описаната процедура се разбира напълно и спазва точно.
2. Както при всички подобни тестове неправилно извършено миене може да причини неточни и невъзпроизводими резултати.
3. Серумни проби, които са силно липемични, силно хемолизирани или мътни не трябва да се тестват с тази процедура.
4. Резултатите от този тест трябва да се използват само в съвкупност с другите диагностични процедури и информация, известна на лекаря.

Re:030104