

НАБОР βЧХГ [¹²⁵I] IRMA

(НОМЕР ПО КАТАЛОГУ: RK-760CT)

Система ¹²⁵I-ЧХГ IRMA позволяет проводить количественное определение человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение βчХГ может проводиться в диапазоне 0-1000 мМЕ/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 50 мкл.

Введение

Человеческий хорионический гонадотропин (чХГ) является гликопротеином с молекулярной массой 38000, который секретируется плацентой. Как и другие гликопротеиновые гормоны (чЛГ, чТСГ и чФСГ), чХГ содержит две различные субъединицы, α- и β-цепь, которые связаны нековалентными связями. Первичные структуры α-субъединиц указанных гормонов практически идентичны. Вместе с тем, наблюдаются различия в β-субъединицах, отвечающих за иммунологическую и биологическую специфичность. Таким образом, специфическое определение чХГ может быть проведено только по его β-компоненту. Уровень чХГ главным образом определяется количеством интактных молекул чХГ; также свой вклад могут вносить свободные субъединицы βчХГ.

чХГ выявляется в сыворотке беременных женщин через 5 дней после имплантации бластоцисты, при этом его концентрация постоянно увеличивается до 3 месяца беременности. Максимальная концентрация данного показателя может достигать 100 МЕ/мл. Затем уровень гормона снижается до 25 МЕ/мл и остается в пределах этого значения до последнего триместра беременности.

Повышение концентрации чХГ может наблюдаться при трофобластических и нетрофобластических новообразованиях, а также при хориокарциноме.

Эктопическая выработка гормона, которая часто наблюдается при метастатическом раке молочной железы, опухолях печени, желудка, легких и матки, зачастую приводит к повышению уровня чХГ у мужчин и у небеременных женщин.

Данная система IRMA особенно эффективна в прямом определении неопластического βчХГ, в то время как уровень гестационного βчХГ может определяться после предварительного разведения сыворотки крови пациента.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоафинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченное ¹²⁵I, связывается с эпитопом молекулы βчХГ,

которая пространственно отличается от молекулы, распознающей биотин-связанным антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса «связанное антитело – антиген – сигнальное антитело», которое также называется «сандвич».

В течение 2-х часового периода инкубирования при непрерывном перемешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь сливается, пробирки тщательно промывают и производят подсчет радиоактивности в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Искомая концентрация βчХГ в образцах пациента может быть определена путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество βчХГ.

Содержание набора

- 1 флакон (21 мл) МЕТКИ, готовой к использованию. Содержит около 980 кБк ¹²⁵I-анти-βчХГ и иммобилизованное анти-βчХГ антитело в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (6 x 0.5 мл), содержащих (S₁-S₆) 0, 5, 20, 80, 300, 1000 мМЕд/мл βчХГ (3d IRP Int. Std) в человеческой сыворотке с 0.1% NaN₃.
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (1.0 мл человеческой сыворотки с 0.1% NaN₃). Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.
- 1 флакон СЫВОРОТКИ ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ (15.0 мл сыворотки с 0,1% NaN₃).
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованных в пластиковые коробки.
- 1 флакон (20 мл) КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА с 0.1% NaN₃. См. *Приготовление реактивов*. Сертификат качества Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (50, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой смеситель, шейкер, полимерная пленка, абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром объемом 1 л (вместо пипеток 2 мл)

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть приготовлены в соответствии с обычной процедурой, которая рутинно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8°C, если исследование проводится в течение 24 часов, в иных случаях аликвоты следует приготовить и хранить в условиях глубокого замораживания (- 20°C). Перед проведением анализа образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторного замораживания / размораживания образцов. Запрещается использовать липемичные, гемолизированные и мутные образцы.

При нормальном течении беременности, даже в течение первых нескольких недель гестации уровень интактного чХГ в сыворотке крови может составлять более 1000 мМЕ/мл. Для того, чтобы избежать повторного проведения анализа образцов с высокой концентрацией чХГ, образцы необходимо развести в соотношении 1:250 при помощи сыворотки для разведения, которая входит в состав набора.

Рекомендуется следующая процедура разведения:

Этап А: 10 мкл образца + 90 мкл сыворотки для разведения (разведение 1:10)

Этап В: 10 мкл разведенного в соотношении 1:10 раствора (получен на этапе А) + 240 мкл сыворотки для разведения (окончательное разведение 1:250)

Приготовление и хранение реактивов

Для получения 720 мл промывного раствора необходимо добавить 20 мл концентрата промывного буфера к 700 мл дистиллированной воды. Приготовленный раствор следует хранить при температуре 2-8°C до окончания срока годности.

После вскрытия реактивы следует хранить при температуре 2-8°C. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до окончания срока годности. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Тщательно перемешайте все реактивы и образцы перед использованием. Избегайте чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте пробирки с покрытием в двух экземплярах для

каждого из стандартов (S1-S6), контрольной сыворотки и образцов.

3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы, путем аккуратного перемешивания, при этом избегайте пенообразования.
4. С помощью пипетки поместите по 50 мкл стандартов, контроля и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Для фиксации пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок по 200 мкл метки.
6. Запечатайте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и установите необходимую скорость с тем, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
7. Инкубируйте пробирки в течение 2 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании.
8. Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. На 2 минуты поместите штатив в перевернутом положении на фильтровальную бумагу.
9. Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 8 еще два раза.
10. Определите радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение как минимум 60 секунд.
11. Рассчитайте концентрацию βчХГ в образцах так, как это описано в разделе «расчет результатов», либо используйте для этого специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Всего	Стандарт	Конт-роль	Обра-зец
Стандарт		50		
Контроль			50	
Образец				50
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 2 часов при комнатной температуре				
Промывоч-ный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Промывоч-ный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Промывоч-ный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Подсчитать радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с теми, которые представлены в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение радиоактивности в минуту (CPM) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца, соответственно, с использованием следующей формулы:

$$V/T(\%) = \frac{S_{2-6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_1 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график V/T (%) для каждого стандарта против соответствующей концентрации βчХГ.

Определите концентрацию βчХГ в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, выходящие за пределы диапазона калибровочной кривой.

Из доступных компьютерных программ для обработки данных в данном случае возможно использовать логит-преобразование или сплайновые методы. Также возможно использование автоматизированной системы обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Среднее значение cpm	V/T%	βчХГ мМЕ/мл
T	386282		
S1	103		0
S2	628	0.136	5
S3	2278	0.563	20
S4	7331	1.871	80
S5	26372	6.800	300
S6	69725	18.024	1000
C	2831	0.706	25.65

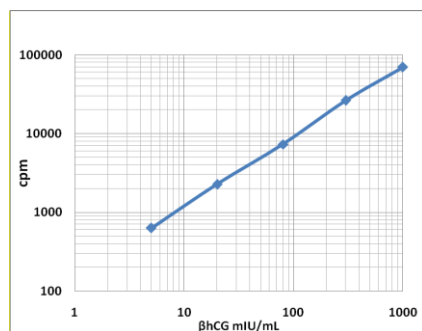


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для расчета значений образцов)

Характеристика количественного определения

Типичные параметры количественного определения

NSB/T < 0,3 %

Чувствительность

Значение аналитической чувствительности (0,651 мМЕ/мл), было получено в результате количественного определения

20 копий нулевого стандарта. Чувствительность была определена как концентрация, соответствующая сумме среднего значения cpm и его двух стандартных отклонений.

Эффект крючка

При концентрациях βчХГ до 140000 мМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует.

Специфичность

Моноклональные антитела, которые используются в данном наборе IRMA, являются специфичными для βчХГ. При нормальных физиологических концентрациях не было выявлено перекрестной реактивности с чФСГ и чЛГ и чТСГ.

Точность

Для оценки точности результатов, получаемых в ходе количественного определения, было проанализировано 4 образца в 15 повторях. Ниже в таблице представлены полученные значения.

Образец	Количество повторов	Среднее значение	CO	CV %
1	15	59.69	1.97	3.3
2	15	84.96	1.95	2.3
3	15	149.1	3.58	2.4
4	15	304.0	6.69	2.2

Воспроизводимость

Для определения точности результатов, получаемых в ходе нескольких количественных определений, были дважды проанализированы 4 образца в 15 независимых повторях, которые были выполнены двумя операторами с использованием наборов из различных партий. Ниже в таблице представлены полученные значения.

Образец	Количество анализов	Среднее значение	CO	CV %
1	15	151.1	7.71	5.1
2	15	264.8	4.77	1.8
3	15	358.6	9.68	2.7
4	15	512.6	13.8	2.7

Восстановление

Под восстановлением понималось измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным уровнем βчХГ. Средний процент восстановления для 4 образцов сыворотки с пиковыми значениями βчХГ на 5 уровнях составлял 101.99 ± 4.1 (среднее значение ± CO).

Тест разведения (линейность)

Исследование 3 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Приведенная ниже формула, полученная для измеренной (Y) концентрации в сравнении с ожидаемой (X), указывает на хорошую линейность:

$$y = 0.9787x + 1.8981 \quad R = 0,9995 \quad n = 15$$

Ожидаемые значения

Здоровые взрослые мужчины и женщины в пременопаузальном периоде (за исключением беременных женщин): < 5 мМЕ/мл.

На 16 неделе гестации: 35000 мМЕ/мл (1МоМ).

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственный диапазон эталонных значений для своей популяции пациентов.










Примечания к методике

- 1) Источник ошибки!** Пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы эти пробирки не смешались с обычными пробирками для проведения исследований. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования. Оставшиеся после работы пробирки следует складывать обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется помечать маркером.
- 2) Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное перемешивание может привести к эффективности количественного определения.
- 3) Добавление промывного буфера.** Для добавления промывочного буфера рекомендуется использование обычного лабораторного диспенсера со стеклянной емкостью объемом 1 л и гибкого выпускника для пробирки. При отсутствии данного оборудования можно использовать шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1) и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) или других инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 60 мг.

	Использовать до	CONTROL	Контроль
	Номер партии	CAL	Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам	CT	Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность	TRAC	Метка
	См. руководство по использованию	WASHB	Промывной буфер
	Устройство для проведения диагностики in vitro	DIL	Сыворотка для разведения
	Производитель		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
REF	Номер по каталогу		Радиоактивный материал



Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были индивидуально протестированы с использованием утвержденных методов (ИФА, иммуноферментный анализ). В

Сайт: <http://www.izotop.hu>
 Технический e-mail: immuno@izotop.hu
 Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



INSTITUTE OF ISOTOPES CO. LTD.
 1535 Budapest. Pf.: 851.
 Тел.: (36-1)392-2577,
 Факс: (36-1)395-9247

Обновлено: 31.01.2014