

Bio-HCG Subunidad β Libre

Inmunoensayo enzimático para la cuantificación de la subunidad Beta Libre de la hormona Gonadotropina Coriónica Humana (β -HCG) en suero.

INTENCIÓN DE USO

El kit β -HCG ELISA está destinado para la cuantificación de la concentración de la subunidad Beta libre de HCG en suero humano por ensayo inmunoenzimático colorimétrico.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit β -HCG es un método de ensayo sándwich en fase sólida basado en el principio de estreptavidina-biotina. Los estándares, las muestras y el reactivo biotinilado anti-free β -hCG son añadidos a los pocillos recubiertos con estreptavidina. La free β -hCG en las muestras se unen al anticuerpo biotinilado. Simultáneamente, el anticuerpo biotinilado se une a la placa recubierta con estreptavidina. El buffer de lavado lava la proteína no unida y el exceso de anticuerpo conjugado con biotina. Tras la adición del reactivo anti free β -hCG HRP enzima conjugada, se forma un complejo sándwich, donde el free β -hCG está entre los dos anticuerpos altamente específicos, marcados con biotina y HRP. El buffer de lavado lava la proteína no unida y el exceso de reactivo de enzima conjugada. Tras la adición del sustrato, la intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de free β -hCG en las muestras. Se prepara una curva estándar que relaciona la intensidad del color con la concentración de free β -hCG.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Microposos recubiertos con anticuerpos	12x8x1
2. Estándares de hCG : 6 viales (listos para su uso)	0.5 ml
3. Reactivo Anti- free β -hCG Biotin 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
4. Anti- free β -hCG HRP Enzima Conjugada: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
5. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12ml
6. Solución de Frenado: 1 botella (listo para su uso)	12ml
7. Solución de Lavado Concentrado 20X	25ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de:

1. Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de éste puede dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelamiento descongelamiento de la muestra.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deberán ser traídos a la temperatura ambiente (18°-25°C) antes de su uso.
2. Preparar solución de lavado a 1x diluyendo en 735ml de agua destilada o desionizada el frasco de buffer de 15ml a 50x.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°- 26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8 °C.
2. Agregue 25 µl de estándares, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Dispense 100 µl de Reactivo Anti- free β-hCG Biotin en cada pocillo.
4. Mezclar durante 10 segundos e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos 5 veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
6. Dispense 100 µl de HPR Enzima Conjugada en cada pocillo y mezcle durante 5 segundos.
7. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos 5 veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
9. Vierta 100 µl de reactivo TMB.
10. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
11. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo y mezcle entre 5-30 segundos.
12. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule los valores de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, control y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/ml sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
3. Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de β-hCG en ng/ml desde la curva estándar.
4. Valores sobre 250 ng/ml deberán ser retesteados luego de diluir con "0" standard.

Estandar ng/mL	OD (450 nm)
0	0.008
5	0.087
10	0.170
25	0.458
100	1.482
250	2.603

VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de HCG pueden usar rangos utilizados solo como guía:

Rango Normal β-hCG = Menor de 5 ng/ml

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. No utilice ácido de sodio como conservador ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

REFERENCIAS

1. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. Clin Chem 1997; 43 (12):2233-43.
2. Choi MJ; Choe IS; Kang HK; Lee JS; Chung TW. Simple enzyme immunoassay for the simultaneous measurement of whole choriogonadotropin molecules and free beta-subunits in sera of women with abnormal pregnancies or tumors of the reproductive system. Clin Chem 1991; 37(5):673-7.
3. Trundle DS; Chou PP; Raymond A. Automated determination of human choriogonadotropin by use of microparticle capture analysis. Clin Chem 1990;36(3):554-6
4. Mantzavinos T; Phocas I; Chrelias H; Sarandakou A; Zourlas PA. Serum levels of steroid and placental protein hormones in ectopic pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1991; 39(2):117-22