

INTENCIÓN DE USO

El equipo HCG CLIA se destina para la determinación cuantitativa de concentración de **HCG** en suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La hormona gonadotropina coriónica (HCG) es una glicoproteína con un peso molecular de 46,000 Daltons. La HCG es inicialmente secretada por las células del sincitiotroblasto placentario poco después de la implantación del ovulo fecundado en el útero.

El rápido aumento de los niveles de HCG en suero después de la concepción hace a esta hormona un excelente marcador para la confirmación temprana y monitoreo del embarazo.

Los niveles de HCG pueden ser medidos en sangre u orina. Más comúnmente, es utilizada como una prueba de embarazo, realizada para indicar la presencia o ausencia de un embrión implantado. La prueba de HCG también es usada para el diagnóstico o seguimiento de tumores de células germinales y enfermedad gestacional trofoblásticas.

La hormona placentaria, HCG, es similar a la hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Todas estas son glicoproteínas que consisten en dos subunidades no similares unidas no covalentemente, designadas como alfa y beta, con cadenas laterales de carbohidratos. Las subunidades alfa de estas glicoproteínas son muy similares. En contraste, la subunidad beta determina la función biológica y especificidad inmunoquímica.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba de HCG CLIA es una fase sólida de dos sitios de inmunoensayo. Un anticuerpo monoclonal se aplica sobre la superficie de los pocillos de microtitulación y otro anticuerpo monoclonal marcado con rábano picante peroxidasa se utiliza como trazador. Las moléculas de HCG presente en la solución estándar o suero forman un "sándwich" entre los dos anticuerpos. Después de la formación de la cubierta de anticuerpos antígeno-anticuerpo-complejo enzimático, la enzima no unida se elimina por el lavado. La actividad de peroxidasa de rábano unido en los pozos de entonces se analiza con las reacciones de Quimioluminiscencia. La unidad de luz relacionada es proporcional a la concentración de hCG presente en la de la muestra.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 96 pocillos impregnados con anti HCG
2. Reactivo Enzima conjugada 2 frascos de 6 ml.
3. HCG estándar de referencia (10, 25, 50, 100, 500, y 1000 mIU/ml) estándar liofilizado
4. CLIA Sustrato A, 6.0ml
5. CLIA Sustrato B, 6.0ml
6. Control 1, 1.0 ml
7. Control 2, 1.0 ml
8. PBS en polvo, 2 bolsas de 5 g.
9. Papel adhesivo para placa, 2 piezas.
10. 1 bolsa zip-lock.
11. Instructivo de uso.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada.
2. Pipetas de precisión 20µl-200 µl , 100µl-1000 µl (se recomienda el uso de puntillas desechables)
3. Luminómetro.
4. Mezclador Vórtex o Equivalente.
5. Lavador de Micropozos.
6. Papel absorbente o una toalla de papel.
7. Sueros para el control de calidad.
8. Incubadora.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Almacene todos los componentes a 2-8°C. No lo congele. Evitar la luz intensa.
2. Colocar los pocillos no utilizados en la bolsa zip-lock con desecante proporcionado y volver a 2-8°C condiciones en que los pozos se mantendrán estables durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad marcada, lo que ocurra primero.
3. Almacene los calibradores reconstituidos entre 2-8°C, condiciones en que los reactivos se mantendrán estables durante 3 días. Para usar por más tiempo los calibradores, almacene en alícuotas y congelar a -20°C, condiciones en que se mantendrá la estabilidad por 2 semanas.
4. Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, condiciones en que se mantendrá la estabilidad durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad marcada, lo que ocurra primero.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. El suero es el tipo de muestra recomendado para este ensayo. Las muestras de plasma con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con los procedimientos de prueba y debe ser evitado.
2. Recoger todas las muestras de sangre y observar las precauciones universales para la venopunción.
3. Permita que la muestra se coagule antes de la centrifugación.
4. Evite muestras excesivamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
5. Las muestras pueden almacenadas hasta 48 horas de 2-8°C Durante más tiempo de almacenamiento congelar a -20°C. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la prueba

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso durante al menos 30 minutos. Mezclar todos los reactivos por inversión suavemente o girando antes de su uso. No provocar la formación de espuma.
2. Ajustar la incubadora a 37 grados.
3. Reconstituir cada calibrador liofilizado con 1 ml de agua destilada. Mezclar bien con un vórtex antes de su uso.
4. Reconstituir cada control con 1 ml de agua destilada y mezclar bien con vórtex durante 1 minuto. Permita que el material reconstituido repose durante al menos 10 minutos.
5. Para preparar Buffer de Lavado: añadir una bolsa de PBS-T en Polvo a 500ml de agua destilada y mezclar. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente durante dos meses.
6. Determinar la cantidad que de la solución de sustrato necesario y preparar mezclando volúmenes iguales de sustrato A y B en un recipiente limpio. Por ejemplo, añadir 1 ml de sustrato A y 1 ml de sustrato B por 2 tiras de ocho pocillos (quedara un ligero exceso de material preparado). Deseche la porción no utilizada si no se utiliza dentro de 20 minutos después de la mezcla.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Utilizar sólo el número de pozos requeridos y el formato de microplacas de pozos para cada calibrador y las muestras a analizar.
2. Añadir 20 µl de los calibradores o controles o muestras al pozo asignado.
3. Añadir 100 µl de Enzima Conjugada a cada pocillo. Agitar durante 10 minutos para mezclar completamente.
4. Cubrir la placa con papel adhesivo blanco, incubar a 37°C durante 60 minutos.
5. Retire la mezcla de incubación vaciando el contenido de la placa en un recipiente de residuos. Enjuague los pocillos 5 veces con solución PBS de lavado. Golpee los pozos enérgicamente sobre papel absorbente para eliminar las gotas de agua residual.
6. Añadir 100 µl de la solución de sustrato a cada pocillo y mezclar por 10 segundos.
7. Poner la microplaca en la cámara de detección del Luminómetro durante 5 minutos, a continuación, leer el valor de RLU de cada pocillo.

NOTAS IMPORTANTES

1. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad
2. No mezclar o usar componentes con diferentes lotes.
3. Se recomienda que no se monten más de 32 pozos en cada ensayo, si el pipeteado es manual, ya que todas los estándares, muestras y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Un plato de 96 pozos puede ser utilizado si la pipeta es automática.
4. Vuelva a colocar las tapas de los reactivos inmediatamente.
5. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y resultados inválidos.

CÁLCULO DE RESULTADOS

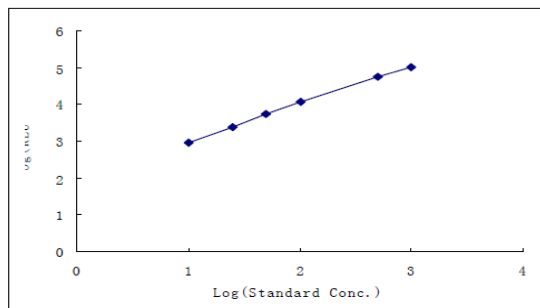
Construya una curva estándar trazando el RLU obtenido a partir de cada Standard de referencia en contra de su concentración en $\mu\text{IU/ml}$ en papel logarítmico cuadrado, con valores RLU en la vertical o eje Y y las concentraciones en la horizontal o eje X. Utilice el RLU valores para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de la HCG en $\mu\text{IU/ml}$ de la curva estándar. Cualquier espécimen diluido debe ser corregido por el factor de dilución apropiado.

VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. La siguiente información se da sólo para orientación. Aproximadamente el 95% de la población sana normal tiene los niveles de HCG menores a 10mIU/ml.

EJEMPLO DE CURVA STANDARD

HCG (mIU/mL)	RLU's
10	916
25	2541
50	5786
100	11808
500	58514
1000	105607



PERFORMANCE

1. Sensibilidad

La sensibilidad analítica definida como la concentración correspondiente a la media de RLU's de 10 repeticiones del diluyente del calibrador más 2 desviaciones estándar, es ≤ 5 mIU/mL.

2. Especificidad

Este ensayo fue diseñado para tener una especificidad analítica de no más de 5 mIU/mL, con las sustancias enlistadas enseguida con las concentraciones ahí marcadas, en suero humano sin HCG.

Sustancias de interferencia	Concentración
TSH	500 $\mu\text{IU/ml}$
LH	500 mIU/ml
FSH	500 mIU/ml

3. Precisión

Intra-ensayo. Se determinó analizando 20 repeticiones de cada uno de los sueros de control

Suero	Número	Media	Desviación estándar	CV (%)
Titulación Baja	20	88.23	6.15	6.97
Titulación Alta	20	279.65	12.06	4.37

Inter-ensayo. Se determinó analizando duplicados de cada uno de los sueros de control en 10 corridas por separado.

Suero	Número	Media	Desviación estándar	CV (%)
Titulación Baja	10	91.27	7.25	7.94
Titulación Alta	10	281.64	16.34	5.80

No se produjo efecto gancho con concentración de HCG hasta 100,000 mIU/mL.

CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren que las muestras de control de calidad deben procesarse con cada curva de calibración para verificar el rendimiento del ensayo. Para asegurar el funcionamiento adecuado, un número estadísticamente significativo de los controles deben ser analizados para establecer los valores medios y rangos aceptables. Controles que contengan ácido de sodio no debe ser utilizado.

REFERENCIAS

1. Cole LA. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009; 7:8.
2. Gregory JJ Jr, Finlay JL. Alpha-fetoprotein and beta human chorionic gonadotropin: their clinical significance as tumor markers. *Drugs.* 1999; 57 (4): 463:467.
3. Steier JA, Sandvei R Myking OL. Human chorionic gonadotropin in early normal and pathologic pregnancy. Discordant levels in peripheral maternal blood and blood from the uterine and abdominal cavities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1986; 154(5): 1091-1094.
4. Swaminathan N, Bahl OP. La disociación y la recombinación de las subunidades de coriónica humana Gonadotrofina. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 40:4227.