



HgB-HSA kombi teszt

H-1047 Budapest, Attila u. 126.
+36-1-369-0739, +36-1-380-4500
+36-1-369-4383
business@diagnosticum.hu

ELISA reagenskészlet colorectalis carcinoma (CRC) szűrővizsgálatára

Kiszerelés: 24 tesztcsik

Gyári kódszám: 10321

ENKK nyilv. szám: HU/CA01/058885/16

A KÉSZLET TARTALMA:

anti-human Hgb-HSA kettős immunitású poliklonális ellenanyaggal érzékenyített mikrotitráló lemez	96 vizsgálatához	2 db
Human szérum albumin (HSA) standard (5db.)		100µl
magas kontroll (rózsaszín)		100 µl
alacsony kontroll (kék)		100 µl
Anti-humán Hgb-HSA-HRPO konjugátum (sárga)		120µl
Konjugátum hígító puffer		30ml
Tris-EDTA-Tween 20 (TTBS) mosó-hígító puffer (10x)		50ml+130ml
TMB szubsztrát oldat		2x16 ml
0,25M kénsav		2x18ml
Lezáró öntapadó lap		4 db

A VIZSGÁLAT ELVE:

A **HgB-HSA kombi teszt** egy szilárdfázisú enzim-immunassay, mely a széklemtintában lévő két vérfehérje (hemoglobin és albumin) egyidejű meghatározásán alapul. A széklemtintában lévő vérfehérjék az ELISA lemez mélyületeihez kötött kettős immunitású-, azaz anti-human hemoglobin (a-huHgb) és anti-human szérumalbumin (a-HSA) -specifitású poliklonális ellenanyaggal reagálnak. A következő lépésben a vizsgálati lemez felületén kialakult immunkomplexeket reagáltatjuk a specifikus anti-HgB -HSA peroxidáz-enzimmel jelzett immunglobulinnal (konjugátumaival). Pozitív esetben kapott immunkomplexek az enzim specifikus szubsztrátjával (TMB) kapott színreakció alapján fotometriásan értékelhetők. A színreakció arányos a kialakult immunkomplexek mennyiségével és megfelelő kalibrátorok segítségével értékelhetők.

A MÉRÉS ELVÉGZÉSÉHEZ SZÜKSÉGES EGYÉB ANYAGOK ÉS KÉSZÜLÉKEK:

Ionmentes vagy desztillált víz
5-40, 20-200, és 200-1000, 5000 µl-es automata pipetták
Üvegedények a hígításhoz és méréshez
37 °C-os termosztát
ELISA fotométer, 450 nm-es színszűrővel

A KIT TÁROLÁSA, KEZELÉSE:

A kit minden komponensét 2-8 °C-on kell tárolni.
Felhasználni a címkén feltüntetett ideig szabad.
Egy órával a felhasználás előtt a szükséges komponenseket hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni. A vizsgálat megkezdéséig a titrálólemez szükséges mennyiségű tesztcsikjait se vegyük ki a fóliából, a maradék csíkokat lehetőség szerint forrasszuk vissza, óvjuk a nedvességtől.
A hígított reagenst nem tároljuk, ne használjuk fel későbbi vizsgálatokhoz!
A különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők egymással!

ELŐÍRÁS ÉS FIGYELMEZTETÉS:

A készlet némelyik komponense konzerválólóként nátrium azidot, tiomersált és antibiotikumot tartalmaz.
A kontrollokat és a mintákat potenciális biológiai veszélyforrásként kell kezelni, és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani: ne pipetázzuk szájjal, felhasználás közben ne együnk, ne igyunk, ne dohányozzunk, használjunk gumikesztyűt! Vigyázzon, hogy ne történhessen tűszúrás, hámsérülés, vagy nyálkahártyára fröccsenő anyag miatt önfertőződés. Munka után a használt eszközöket a vonatkozó szabályozásoknak megfelelő dekontaminálás után dobjuk el és mossunk kezet!
Különösen ügyeljünk a pipetta hegyek és a hígító edények tisztaságára, a szennyeződött komponensek nem használhatóak fel további mérésekhez. A vegyszer és mosószert maradványok gátolhatják, vagy beindíthatják a reakciót!
Megfelelő eredményt csak az előírások pontos betartása esetén kapunk!
Csak *in vitro* diagnosztikai célra használható, és kizárólag gyakorlott laboratóriumi szakember használhatja!

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE:

1. HÍGÍTÁS, ELŐKÉSZÍTÉS:

- A 10x tömény TTBS-Tween 20 mosó-hígító pufferből készítsünk ionmentes vagy desztillált vízzel hígítva 1:10 arányú, 1x tömény mosó-hígító puffert. (Pl.: 6 sor használata esetén 10ml 10x tömény puffert 90ml ionmentes vagy desztillált vízzel hígítsunk).
- A standard-ekből elkészítjük a megfelelő standard görbe koncentrációs pontjait:
Standard pontok: 50; 25; 12,5; 6,25 ; 3,12 ng/ml. Első lépésben készítsünk 1:1000 hígítást a tömény kalibrátor oldatokból (pl. 5µl tömény standard-t mérjük 5ml 1x mosó-hígító pufferbe). Alaposan keverjük össze (pl. Vortex-el), majd készítsünk 1:200 hígítást (pl. 5µl 1:1000 standard-t mérjük 1ml mosó-hígító pufferbe).
- A magas és alacsony kontroll mintákból készítsünk hígítást: első lépésben készítsünk 1:1000 hígítást a tömény kontroll oldatokból (pl. 5µl tömény kontrollt mérjük 5ml 1x mintahígító pufferbe). Alaposan keverjük össze (pl. Vortex-el), majd készítsünk 1:200 hígítást (pl. 5µl 1:1000 standard-t mérjük 1ml mosó-hígító pufferbe).
- A mintavételhez a Sentinel mintavevő (FOB Gold Tube NG, Ref.11561N) használatát javasoljuk. A vizsgálandó mintákból a mintavevő használati útmutatója szerint vegyünk mintát, mely mintavevő pufferben a széklet 1:250-re hígul. A minta a mintavétel és a vizsgálat között szobahőmérsékleten (20-25°C) maximum 7, hűtőben (0-+4°C) 14 napig tárolható. Készítsünk további 1:2 arányú hígítást (minta véghígítása 1:500) az 1x tömény mosó-hígító pufferrel (pl. 150µl mintavevő pufferben lévő széklet mintát keverjük jól össze 150µl 1x mosó-hígító pufferrel).

2. MINTA FELVITEL:

- MÉRJÜNK be 100µl TTBS puffert (blank) és 100-100µl-t a hígított standard pontokból (standard1.-5.:3,12-50ng/ml), és a kihígított alacsony és a magas pozitív kontrollokból HgB-HSA lemez megfelelő mélyületeibe. Végezzünk párhuzamos méréseket.
- MÉRJÜNK 100-100 µl-t a kihígított vizsgálandó székletmintákból a megfelelő sorok további mélyületeibe. Ebben az esetben is érdemes párhuzamos méréseket végezni.
- Inkubáljuk a lemez sorait öntapadós fedőlemezzel lezárva 60 percig 37°C-on.

4. MOSÁS:

- Öntsük ki a lemez mélyületeiből a nem reagált anyagokat.
- A maradék cseppeket papírvattával itassuk le
- Mossuk a sorok mélyületeit nyolcszor 250-250 µl mosópufferrel

5. KONJUGÁTUM FELVITELE:

- A konjugátumból a konjugátum hígító pufferrel készítsük el a megfelelő hígítást: anti-HgB-HSA-HRP 1:300
Pl.: 6 sor használata esetén 20µl tömény konjugátumot hígítsunk 6000µl-re konjugátum hígító pufferben.
- MÉRJÜNK 100-100 µl-t a hígított konjugátumokból a lemez mélyületeibe.
- Inkubáljuk a lemez sorait öntapadós fedőlemezzel lezárva 37°C-on 60 percig.

6. MOSÁS:

- Öntsük ki a lemez mélyületeiből a nem reagált anyagokat.
- A maradék cseppeket papírvattával itassuk le
- Mossuk a sorok mélyületeit nyolcszor 250-250 µl mosópufferrel

7. SZUBSZTRÁT REAKCIÓ:

- MÉRJÜNK a sorok mélyületeibe 100-100 µl TMB szubsztrát oldatot.
- Inkubáljuk lefedve, fénytől védve, szobahőmérsékleten 30 percig
- Az inkubációs idő lejártá után minden mélyületbe mérjük be 100-100 µl kénsavat, a fotometriás mérés előtt ajánlatos a lemezt kissé megrezegtetni.

8. MÉRÉS:

- A kénsav bemérése után ELISA fotométeren, 450nm-en, levegővel szemben olvassuk le a fényelnyelési értékeket. A mérést a leállítást követő 5 percen belül végezzük el. A háttér csökkentése érdekében 630nm-es differenciálszűrő használata ajánlott.

9 ÉRTÉKELÉS:

- Számoljuk ki a párhuzamos mérések és a vak kontroll 450/630 nm-en mért OD értékeinek átlagát. Minden standard pont OD_{450/630} átlagából vonjuk le a vak kontroll OD_{450/630} átlagát.
- A standard pontokra kapott a vak kontrollal korrigált OD_{450/630} értékeket ábrázoljuk a standard pontok koncentrációjának - mely a teszt HgB-HSA egyenértékeinek felel meg - függvényében.
- A kontroll és a minták OD_{450/630} abszorbanciájának átlagából vonjuk le a vak kontroll OD_{450/630} abszorbanciájának átlagát, és az így kapott értékek koncentrációját, azaz HgB-HSA egyenértékét olvassuk vissza a kalibrációs görbéről.
- Automatizált módszer esetén a 4 paraméteres logisztikus értékelés használatát javasoljuk.
- A mérés elfogadható, ha a kontrollokra kapott HgB-HSA egyenérték a megadott értéktartományba esik (alacsony kontroll: 7ng/ml-15ng/ml; magas kontroll >20ng/ml).
- A minta pozitív, ha az így meghatározott HgB-HSA Ab-egyenérték nagyobb, mint 10.

10. TELJESÍTMÉNY JELLEMZŐK:

10. 1. Linearitás:

A kalibráló görbe regressziós egyenese az 1,56-50 ng/ml tartományban : $y = 0,4348 \ln x - 0,3569$, $R^2 = 0,994$;

10. 2. Analitikai Érzékenység:

LOQ (Limit of Quantitation):0,61ng/ml, LOD (Limit of Detection):0,3ng/ml

10.3. Szenzitivitás, specificitás

A teszt diagnosztikai jellemzőinek (szenzitivitás, specificitás, prediktív) értékeit az Onkológiai Intézetnél összesen kapott 200 db. székletminta mérését elvégezve a betegmintákra adott kolonoszkópiás vizsgálati eredményeket (gold standard) alapul véve határoztuk meg. Ennek alapján a teszt szenzitivitása: 65% specificitása: 83% + Prediktív:80% - Prediktív: 69%

10.4. Intra-assay:

Hgb-HSA lemezen (n=10)

	HgB-HSA egyenérték átlag	CV%
1. minta	4,46	7
2. minta	5,72	5,4
3. minta	10,9	5,9
4. minta	12,3	7,7
5. minta	16,7	5,6

10.5. Inter-assay

Hgb-HSA lemezen (n=5)

	HgB-HSA egyenérték átlag	CV%
1. minta	6,03	5,9
2. minta	11,9	6,7
3. minta	18,9	9,6

A címkéken a következő szimbólumok találhatóak



In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz



CE-jelölés



Tárolási hőmérséklet



Lejáratási idő (év/hónap)



Gyártási szám



Kódszám



Biológiai veszély

IRODALOM

Ottó Sz, Németh M : Double immunochemical screening test (haemoglobin and albumin) for the detection of occult intestinal bleeding. J Clin Lab Anal 7:301-306,1993