



Набір ІФА для кількісного визначення в сироватці людини загального ХОРИОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ (ХГЛ ТА ХГЛ-бета)

Кат. № : EIA-1911
Кількість : 96
Виробник : DRG (Німеччина)

Методика від 10-2011
Версія 7.0

1. ВСТУП

1.1 Застосування

Набір імуноферментного аналізу **DRG β -HCG** містить компоненти для кількісного визначення загального хоріонічного гонадотропіну людини (hCG та β -hCG) в сироватці.

1.2 Короткий опис та роз'яснення

Хоріонічний гонадотропін (ХГ) – глікопротеїновий гормон, який звичайно виробляється плацентою під час вагітності. Після запліднення рівень ХГ різко зростає і досягає максимуму до кінця першого триместру. Високі концентрації спостерігаються під час всієї вагітності. Після народження рівень ХГ в сироватці швидко зменшується і до кількох днів досягає величин, що не піддаються визначенню.

Молекула ХГ складається з альфа-і бета-субодиниць. Альфа-субодиниця майже ідентична з такою інших глікопротеїнових гормонів, таких як Тиреоїд Стимулюючий Гормон (ТТГ), Лютеїнізуючий Гормон (ЛГ) і Фолікулоstimулюючий Гормон (ФСГ); різниця в бета-субодиницях цих гормонів відповідає їхній біологічній функції і з нею зв'язана імунологічна специфічність.

Моноклональні антитіла проти бета-субодиниць ХГ відіграють визначну роль для диференціації ХГ з іншими гормонами.

Набір дозволяє проводити раннє діагностування вагітності.

Також разом з підвищенням концентрації ХГ під час вагітності її зростання може бути обумовлене пухлинами трофобластного і нетрофобластного походження, такі як гідатіформна хвороба, хоріонепітеліома, карцинома ембріональних клітин і багато інших.

2. ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Набір є твердофазним ферментнозв'язаним імуносорбційним аналізом (ELISA), створеним за принципом "сандвіча".

Лунки на мікропланшеті покриті моноклональним антитілом проти антигенів на бета-ланцюгу молекули ХГ. Зразок сироватки пацієнта з ендogenous ХГ інкубується у лунці разом з ензимним кон'югатом (анти-ХГ-сироватка, кон'югована з пероксидазою хрому). Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається водою.

Кількість зв'язаної пероксидази прямо пропорційна концентрації ХГ в зразку. Після додавання субстрату інтенсивність утвореного забарвлення пропорційна концентрації ХГ в зразку пацієнта.

3. ПОПЕРЕДЖЕННЯ та ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro".
2. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
3. Перед початком аналізу, прочитайте інструкцію уважно і повністю. Використовується актуальна версія вкладишу, який поставляється в наборі. Будьте впевнені, що всі все розуміють.
4. Мікропланшет містить оснащення з смужками. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2 С до + 8 С в герметичній упаковці і використовуються в рамках передбачених.
5. Піпетування проб і реагентів повинно бути зроблено так швидко, як це можливо і в тій же послідовності для кожного кроку.
6. Використовуйте посуд тільки для одного типу реагентів. Використання емностей для дозування розчину субстрату, може виявитися рішенням кольору. Не лейте реагентів назад у флакони, може відбутися зараження.

7. Змішати вміст лунок в мікропланшетах повністю, щоб забезпечити гарні результати тестування. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам бути сухим під час аналізу, додайте реагенти відразу після завершення промивання кроків.
9. Довести реагенти до кімнатної температури (21 С -26 С) перед початком тесту. Температура впливає на абсорбцію читання тесту. Проте, значення для зразків пацієнтів не будуть зачеплені.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не курить в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати фальшиві результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення дати придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
16. Не змішуйте реагенти різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
18. Деякі реагенти містять проклін 300, БНД та / або MIT в якості консервантів. У разі попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. ТМБ субстрат має подразнюючу дію на шкіру і слизову оболонку. У разі можливого контакту, промийте очі і шкіру великою кількістю води з милом. Промийте забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні, виведіть людину на свіже повітря.
20. Хімікалії і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Лист Даних Безпеки Матеріалів. Лист Даних Безпеки доступний по замовленню.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікропланшетка з лунками:** 1шт. 96 лунок, покритих анти-бета-ХГ-моноклональним антитілом.
2. **Стандарт (0-5)**, 6 фл. (ліофілізовані), 1 мл. Концентрації 0, 5, 25, 50, 100, 200 мМО/мл.
Конверсія: (1 пг/мл=0,00916 мМО/мл; 1.IRP 75/537).
3. **Розчинник зразків**, 1фл., 10 мл, готовий до використання. Містить 0,3% проклін в якості консерванта.
4. **Ферментний кон'югат**, 1 фл. 11 мл. Анти-бета-ХГ-антитіло, кон'юговане пероксидазою хрому, готовий до використання. Містить 0,3% проклін в якості консерванта.
5. **Розчин субстрату** - ТМБ, 1 фл., 14 мл. Готовий до використання, тетраметилбензидин (ТМБ).
6. **Стоп розчин** - 0,5 М H₂SO₄, 1 фл., 14 мл. Готовий до використання. Уникайте контакту зі стоп розчином, оскільки він може викликати опіки.

Примітка: Додатковий розчинник зразків для розведенні зразків доступний на замовлення.

4.2 Обладнання та матеріали, які не постачаються

- Планшет-рідер (450 нм±10 нм).
- Відкалібровані регульовані високоточні мікропіпетки.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер
- Напівлогарифмічний папір або ПО для обробки даних

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8⁰С активність реагентів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти повинні зберігатись при 2-8⁰С. Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8⁰С. Після відкриття ящика треба знову тісно його запечатати.

4.4 Приготування реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти до кімнатної температури.

Стандарти

Розведіть ліофілізований вміст флаконів стандартів 1,0 мл дистильованою водою.

Примітка: Розведені стандарти стабільні 2 місяці при 2-8°C. Для більш тривалого зберігання заморозьте до -20°C.

4.5 Знищення набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки (див розділ 13).

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника на протязі одного тижня після отримання продукту. Окремі пошкодженні компоненти не слід використовувати.

5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

В цьому аналізі необхідно використовувати сироватку.

Не використовуйте гемолізовані, істеричні, або ліпемічні зразки. Зауваження: В аналізі не варто використовувати зразки з вмістом азиду натрію.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Збирайте кров, пунктуючи вену; дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Уникайте гемолізу. **УВАГА!** Цей набір тільки для роботи з кров'ю без домішок.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8°C 5 днів. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C. Після відтавання зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі, зразок сироватки показує значення вище найвищого стандарту, зразки можуть бути розведені 10- чи 100-кратно розчинником зразків і проаналізовані повторно.

- Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл розчинника зразків (ретельно змішайте)
- Розведення 1:100: 10 мкл розведення 1:10 + 90 мкл розчинника зразків (ретельно змішайте).
- Розведення 1:1000: 10 мкл розведення 1:100 + 90 мкл розчинника зразків (ретельно змішайте).

Примітка: зразки з очікуваними значеннями більше 100 мМЕ/мл необхідно розвести розчинником зразків перед аналізом.

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготвлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить провдити всі кроки за однакових інтервали часу.
- Цей набір дає абсорбцію стандарту 5 більше 1,200 на протязі 10 хвилин при кімнатній температурі. Якщо абсорбція виходить вища чи нижча, ви можете зменшити або подовжити час інкубації кінцевої ферментативної реакції формування забарвлення відповідно до потреб. За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура дослідження (кількісний метод)

Кожна процедура повинна містити стандартну криву.

1. Вставте в штатив необхідну кількість лунок;
2. Додайте по **25 мкл** кожного стандарту, контролю і зразків (кожного разу новим наконечником) у відповідні лунки;
3. Додайте в кожну лунку по **100 мкл** ферментного кон'югату;
4. Добре перемішуйте 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування на даному етапі;
5. Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі;
6. Різно вилийте вміст лунок;
Промийте лунки 5 разів дистильованою водою (400 мкл/лунку); Промокніть лунки на промокальному папері, щоб видалити залишки;
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.
7. Додайте **100 мкл** розчину субстрату в кожну лунку;

8. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі;
9. Зупиніть ферментативну реакцію додаванням в кожну лунку по **50 мкл** стоп розчину.
10. Зчитайте дані на фотометрі при **450±10 нм** впродовж **10 хвилин** після додавання стоп розчину.

6.3 Вирахування результатів (кількісне)

1. Визначте середні значення абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі в мМО/мл.
3. Використовуючи середнє значення абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію ХГ зі стандартної кривої. Опрацювання даних може проводитись і іншими методами, в залежності від досвіду.
4. Автоматизований метод: Результати у вкладиші були визначені автоматично з використанням шаблона кривої 4-параметрової логістики. 4-параметрова логістика бажаний метод. Інші функції обробки даних можуть дати дещо відмінні результати.
5. Концентрацію зразків можливо визначити безпосередньо із калібрувальної кривої. Зразки з концентраціями вище ніж найвищий стандарт необхідно надалі розбавляти або відображати як > 200 мМО/мл. Для вирахування концентрації необхідно взяти до уваги цей коефіцієнт розведення.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0мМО/мл)	0,04
Стандарт 1 (5 мМО/мл)	0,15
Стандарт 2 (25 мМО/мл)	0,28
Стандарт 3 (50 мМО/мл)	0,53
Стандарт 4 (100 мМО/мл)	0,94
Стандарт 5 (200 мМО/мл)	1,50

6.4 Процедура аналізу (якісний метод).

Ця процедура дозволяє відрізнити позитивні зразки (вагітні) від негативних, порівнюючи рівні ХГ зі Стандартами 0 і 50 мМО/мл. Зразки пацієнта тестуються з розчинником Зразків (0 мМО/мл) і Стандартом (50 мМО/мл). Процедура тесту ідентична з Кількісним Методом, проте кроки 9 і 10 пропущені.

6.5 Вирахування результатів (якісне)

Для кількісного аналізу рівнів бета-ХГ, інтенсивність забарвлення порівнюється з кольором стандартів 0 і 50 мМО/мл. Якщо голубе забарвлення зразку менш інтенсивне, ніж колір стандарту 50 мМО/мл, то він вважається негативним. Якщо інтенсивність голубого забарвлення зразку більша або рівна інтенсивності кольору стандарту 50 мМО/мл, то він вважається позитивним.

Наступні дані прикладу стандартної кривої тільки для демонстрації і не повинні використовуватись для інших цілей.

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Настійливо рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

7.1 Здорові дорослі в нормі, не вагітні

Населення	Вік (в роках)	Фактична к-сть	бета-ХГ (мМО/мл)
Чоловіки	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
Жінки	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

7.2 Жінки на 2-му триместрі вагітності

Тиждень вагітності	Оцінка зразків	Відсоток 5% (мМО/мл)	Відсоток 95% (мМО/мл)
14	103	10303	71980
15	96	9246	51666
16	91	5266	36947
17	14	4632	24033

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:

1. Для діагностики вагітності в сироватці порогове значення якісного тесту складає 50 мМО/мл. Негативні чи граничні результати повинні бути наново перевірені на свіжому зразку, взятому щонайменше через 48 годин після забору першого зразка.
2. Хибні результати вагітності можуть визначитись при ревматоїдному артриті. В таких випадках констатацію вагітності треба проводити уважно.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В лабораторной практике рекомендуется использовать контроли для каждой калибровочной кривой. Статистическое значение числа контролей должно быть проанализировано чтоб установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения исследования. Рекомендуется использовать контроли согласно государственным и федеральным правилам.

Использование контроля дает возможность повседневной оценки достоверности результатов. Используйте контроли и нормального уровня, и патологического.

Контроли и соответствующие результаты QC лаборатории указаны в QC сертификате, что поставляется с набором. Величины, указанные в данном сертификате соответствуют лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для подтверждения достоверности результатов.

Используйте соответствующий статистический метод для анализа величин контроля. Если результаты анализа не попадают в установленные границы материалов контроля, результаты являются не достоверными.

В таком случае проверьте следующие данные: устройства пипетирования и измерения времени; фотометр; даты пригодности реагентов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывания.

Если не обнаружено ошибки, обратитесь к Вашему поставщику.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ**9.1 Динамичний діапазон аналізу**

Діапазон аналізу знаходиться в межах 0-200 мМО/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні гормони були протестовані на перехресну реактивність:

Білок	Концентрація	Інтенсивність забарвлення, еквівалент рівню бета-ХГ в сироватці (мМО/мл)
ЛГ	300 мМО/мл	6
ЛГ	200 мМО/мл	< 5
ЛГ	80 мМО/мл	< 5
ТТГ	75 мкМО/мл	8
ТТГ	50 мкМО/мл	< 5
ТТГ	25 мкМО/мл	< 5
ФСГ	200 мМО/мл	< 5
ФСГ	50 мМО/мл	< 5

9.3 Аналітична чутливість

Мінімальний визначений рівень ХГ складає <1,0 мМО/мл.

9.4 Точність**9.4.1 В аналізі**

Зразок	К-сть	Середнє, мМО/мл	КВ, %
1	20	5,9	8,9
2	20	18,5	4,0
3	20	148,1	3,4

9.4.2 Між аналізами

Зразок	Середнє, мМО/мл	КВ, %
1	6	9,9
2	17	7,3
3	140	6,6

9.5 Відтворюваність

Зразок	Додана конц. 1:1 (v/v), мМО/мл	Виміряна конц., мМО/мл	Очікувана конц., мМО/мл	Відтворюваність, %
1	-	148	148	100
	100	113	124	91
	75	110	111,5	99
2	50	91,6	99	93
	-	53,9	53,9	100
	25	36,6	39,45	93
3	50	46,9	51,95	90
	100	68,5	76,95	89
	-	23,9	23,9	100
3	25	23,1	24,45	94
	50	33,7	36,95	91
	100	54,9	61,95	89

8.6 Лінійність

Зразки	Розведення	Середня конц., мМО/мл	Відтворюваність, %
1	Нерозб.	109,8	-
	1:2	56,6	103
	1:4	28,2	103
	1:8	14,4	105
	1:16	7,41	108
2	Нерозб.	117	-
	1:2	54,7	94
	1:4	30,1	103
	1:8	15,8	108
	1:16	7,69	105
3	Нерозб.	94,9	-
	1:2	42,9	90
	1:4	25	105
	1:8	12,8	108
	1:16	6,5	110

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ**10.1 Інтерферуючі речовини**

Будь-яка неналежна робота зі зразками чи зміна тесту може впливати на результати.

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

10.2 Вплив ліків

На сьогодні не виявлено жодних речовин (лікарських засобів), які здійснюють вплив на вимірювання бета-ХГ у зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

При тестуванні не було виявлено жодних побічних ефектів аж до 158 600 мМО/мл бета-ХГ.

11. ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ**11.1 Достовірність результатів**

Тест необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Тестові результати вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші тестові параметри також відповідають тестовій специфікації.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного тесту і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Надійність

Будь-які зміни теста чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах тесту. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться о відповідальності виробника.

ЛІТЕРАТУРА

(Див. в оригіналі інструкції).

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

ПМП «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
Тел.: (0342) 775122 Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua