

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНА В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

EIA-1283, hPL ELISA

Каталог. № : EIA-1283
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2013
Версия 9.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

Набор DRG hPL ELISA является иммуноферментным анализом для количественного определения *in vitro* плацентарного лактогена человека (hPL) в сыворотке.

Данный анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro*.

1.2 Краткое описание и объяснение

Физиологическая роль человеческого плацентарного лактогена до конца не определена, однако, подобность с гормоном роста человека привела к появлению гипотезы про функцию регулятора фотоплацентарного роста и других изменений во время беременности. Было предложено, что уровень ПЛ в сыворотке матери может отображать «индекс плацентарной функции».

Уменьшение уровней ПЛ ассоциируется со смертью в матке, асфиксией плода во время родов. Эта связь особенно сильная, если повторно определяется уменьшение уровней ПЛ, что проявляется хронической плацентарной, а значит и фетальной недостаточностью. Уменьшение концентрации ПЛ обычно не наблюдается, если беременность протекает без осложнений. Повышенные уровни ПЛ обычно указывают на хорошее протекание беременности у беременных с одним плодом. Тем не менее, высокие уровни ПЛ могут указывать на специфическую патологию плода, как сахарный диабет, макросомия плода, резус-иммунизация и водянка.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

DRG hPL набор ИФА - твердофазный иммуноферментный набор (ELISA), основанный на принципе «сендвича». Микротитровальные лунки, покрыты моноклональными антителами к единственному в своем роде антигенам на ПЛ молекулах. Сыворотка пациентов, которая содержит эндогенный ПЛ инкубируется в лунках, покрытых энзимным конъюгатом, (анти-ПЛ-антитело, конъюгированное с пероксидазой). После инкубации несвязанный конъюгат вымывается водой. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации ПЛ в образцах. После добавления раствора субстрата, насыщенность цвета пропорциональна концентрации ПЛ в образце.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для диагностического использования *in vitro*. Только для использования квалифицированным персоналом.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с

образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.

- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты будут получены при использовании калиброванных пипеток.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химические вещества и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Лист данных безопасности доступен по требованию.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитровальные лунки**, покрытые анти-ПЛ моноклональными антителами (96 лунок).
2. **Стандарт (стандарт 1-4)**, 4 фл., 0,5 мл, готовы к использованию; Концентрации: 1,25 – 5,0 – 10,0 – 20 мг/л. Конверсия: 1 мг/л = 1 мМЕд/л.
3. **Нулевой стандарт** (также используемый в качестве разбавителя образца), 1 фл., 90 мл, готов к использованию, 0 мг/л. Содержит консервант.
4. **Контроли Низкий и Высокий**, 2 флакона, 0.5 мл каждый, готовы к использованию. Значения и диапазон указаны на этикетке. Содержит консервант.
5. **Ферментный конъюгат**, 1 фл., 11 мл. Готов к использованию. Анти-ПЛ-антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена. Содержит консервант без ртути.
6. **Раствор субстрата**, 1 фл., 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
7. **Стоп раствор**, 1 фл., 14 мл, готов к использованию. Содержит 0,5 M H₂SO₄. Избегать контакта со стоп-раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.

Примечание: дополнительный нулевой стандарт для разбавления образцов доступен по запросу.

4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный считыватель, способный проводить измерения при (450 нм ± 10 нм).
- Калиброванные регулируемые точные микропипетки.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Пробирки для разбавления образца (12x75 мм).
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

4.3 Условия хранения

Во время хранения при 2-8⁰С не вскрытые реагенты сохраняют свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты по истечению срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8⁰С. Микропланшет необходимо хранить при 2-8⁰С. Как только мешочек из фольги был открыт, необходимо быть внимательным, чтобы его снова плотно закрыть. Вскрытые наборы сохраняют активность в течении 6 недель при хранении как описано выше.

4.4 Приготовление реагентов

Приведите все реагенты и требуемое количество полосок перед использованием к комнатной температуре.

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно местному законодательству. Специальная информация по данному продукту указана в Листах данных по безопасности (См. раздел 13).

4.6 Поврежденные наборы

При существенном повреждении набора или компонентов, не обходимо письменно уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Значительное повреждение отдельных компонентов не допускает их использования в анализе. Их необходимо хранить до разрешения проблемы, после чего уничтожить.

5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа должна использоваться сыворотка.

Не используйте для анализа гемолизированные, иктерические и липемические образцы.

Помните: не должны использоваться образцы, которые содержат азид натрия.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного осаждения. Для пациентов, что получили антикоагулянтную терапию, может быть необходимо большее время для осаждения.

5.2 Подготовка и хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 5 дней при 2-8°C. Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и храниться до проведения анализа. Оттаявшие образцы переверните несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Перед началом анализа образцы необходимо разбавить 0 стандартом 1:100:

1. В одну пробирку для анализа добавьте к каждому образцу по 1 мл нулевого раствора.
2. Добавьте 10 мкл каждого образца в соответствующие пробирки. Перемешайте все пробирки 10 секунд на вихревом смесителе (избегайте пенообразования).

Внутренние контроли (Низкий и Высокий) готовы к использованию и не требуют разведения.

Внешние контроли (такие как Контроли Bio-Rad) использовать как и образцы.

Если начальное разбавление образца даст в результате значение выше, чем наивысший стандарт, образец необходимо дальше разбавить и нулевым стандартом и повторно анализировать как описано. Для вычисления концентраций необходимо учесть этот коэффициент разбавления.

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Перед использованием все реагенты и образцы приведите к комнатной температуре. Все реагенты следует перемешать без образования пены.
- После начала анализа все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени и температуры инкубации. Рекомендуется, чтоб перед началом анализа все необходимые реагенты были приготовлены, крышечки сняты, все нужные лунки установлены в держателе и т.д. Это обеспечит равное время для каждого шага пипетирования без прерывания.
- В основном ферментная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Примечание:

Ручное пипетирование: рекомендуется использование не более чем 32 лунки в одном анализе. Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей необходимо завершить в течение 3 минут.
Автоматизированное пипетирование: может использоваться весь планшет. Однако, рекомендуется, что б пипетирование всех стандартов, образцов и контролей завершить в течение 3 минут. Каждый анализ должен включать стандартную кривую.

1. Закрепите требуемое количество микротитровальных лунок в рамке.
2. Пипеткой внесите **10 мкл** каждого стандарта, контролей и предварительно разбавленных образцов, используя новые одноразовые наконечники, в соответствующие лунки.
3. Добавьте **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку. Тщательно перемешайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **30 минут** при комнатной температуре.
5. Резко встряхните содержимое лунок. Промойте **5 раз** дистиллированной водой (300 мкл на лунку). Резко ударьте планшетом об впитывающую бумагу, чтобы удалить остаток влаги.

Важное замечание:

Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!

6. Добавьте **100 мкл раствора субстрата** в каждую лунку.

7. Инкубируйте **10 минут** при комнатной температуре.
8. Остановите ферментную реакцию добавив **50 мкл стоп реагента** в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки с помощью микротитровального планшетного считывателя при **450 нм ± 10 нм** в течение **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Постройте калибровочную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси Y и концентрации на оси X.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на калибровочной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты были вычислены автоматически при использовании 4 PL (4-параметровой логистической) кривой. Другие функции обработки данных могут дать немного другой результат.
5. Концентрация образцов может считаться с этой калибровочной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо в дальнейшем разбавить или зафиксировать как > 20 мг/л. При вычислении концентрации необходимо учитывать этот коэффициент разбавления.

6.3.1. Типичный пример калибровочной кривой

Последующие данные используются только в демонстрационных целях и **не должны** использоваться вместо обработки данных во время анализа.

Стандарт	(мг/л)	Оптич. единицы (450 нм)
Стандарт 0	0	0,03
Стандарт 1	1,25	0,17
Стандарт 2	5,0	0,65
Стандарт 3	10,0	1,17
Стандарт 4	20,0	1,84

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения. При исследовании данного набора были получены следующие данные:

Неделя беременности	Значение (мг/л)
10-12	0,05-1,0 мг/л
12-14	0,10-1,7 мг/л
14-16	0,3-2,8 мг/л
16-18	0,5-3,5 мг/л
18-20	0,9-4,0 мг/л
20-22	1,1-5,0 мг/л
22-24	1,3-5,8 мг/л
24-26	1,6-6,7 мг/л
26-28	2,0-7,7 мг/л
28-30	2,7-8,5 мг/л
30-32	3,2-9,5 мг/л
32-34	3,7-10,1 мг/л
34-36	4,0-10,7 мг/л
36-38	4,3-11,2 мг/л
38-40	4,4-11,7 мг/л
40-42	4,3-11,6 мг/л

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. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0,04-20 мг/л

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие материалы были проверены на перекрестную реактивность анализа:

Анализируемые антигены	Аналог ЧПЛ
ЧХГ	2000 МЕд/л не определено
АФП	300 КМЕд/л не определено
ЧГР	100 мкг/л не определено
Пролактин 200 мкг/л	не определено

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена для среднего плюс двух стандартных отклонений 20 репликантов анализа 0 стандарта и равно 0,043 мг/л.

9.4. Воспроизводимость

9.4.1 Точность в пределах анализа

Образец	1	2	3
Количество	18	18	18
Среднее (мг/л)	0,66	2,34	6,24
Коэффициент вариации (%)	6,06	5,55	6,73

9.4.2 Точность между анализами

Образец	1	2	3
Количество	39	24	24
Среднее (мг/л)	0,68	2,52	6,87
Коэффициент вариации (%)	8,82	7,14	5,67

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением ПЛ раствора при известной концентрации трех разных сывороток, содержащих разное количество эндогенного аналита.

% извлечения был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Добавл. конц. (мг/л)	Измер. конц. (мг/л)	Ожидаемая* конц. (мг/л)	Извлечение %
1	0,00	0,00		
	0,63	0,55	0,63	88,6
	2,50	2,40	2,50	96,2
	5,00	5,21	5,00	104,2
	10,00	8,58	10,00	85,8
2	0,00	1,93		
	0,63	1,39	1,59	87,6
	2,50	3,16	3,46	91,4
	5,00	5,21	5,96	87,4
	10,00	9,81	10,96	89,5
3	0,00	4,67		
	0,63	2,56	2,96	86,4
	2,50	4,46	4,83	92,3
	5,00	6,69	7,33	91,2
	10,00	11,66	12,33	94,5

9.6 Линейность

Образец	Разведение	Измер. конц. (мг/л)	Ожид. конц. (мг/л)	Извлечение, %
1	Неразв.	1,93	1,93	
	1:2	0,84	0,96	86,7
	1:4	0,45	0,48	93,7
	1:8	0,26	0,24	108,0
	1:16	0,12	0,12	95,5
2	Неразв.	4,67	4,67	
	1:2	2,28	2,33	97,5
	1:4	1,06	1,17	90,7
	1:8	0,64	0,58	109,2
	1:16	0,31	0,29	106,3

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

10.1 Влияющие вещества

Неправильное обращение с образцами или модификация анализа может влиять на результаты.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

Не наблюдалось эффекта до 700 мг/л ЧПЛ.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа. Тестовые результаты достоверные, только, если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться только на результатах лабораторных исследований, даже если все результаты теста согласованы с элементами в п.11.1. Любой лабораторный результат является только частью общей клинической картины пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основании которого ставится терапевтическое заключение.

11.3 Ответственность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты анализа.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не являются ответственностью производителя.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com