

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ШВИДКОГО ВИЗНАЧЕННЯ $\beta$ -СУБОДИНИЦІ ХОРИОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ ЛЮДИНИ МЕТОДОМ ІФА

## Rapid B-Human Chorionic Gonadotropin (Rapid-hCG)

### Test System

Кат. №: 3325-300A

Дата випуску інструкції: 06-07-2012

Версія: 3



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

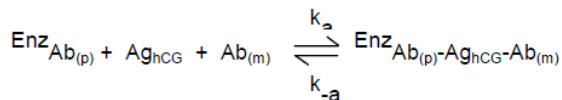
Візуальне якісне або спектрофотометричне напівкількісне визначення ХГЛ в сироватці або сечі за допомогою імуоферментного мікропланшетного аналізу для раннього виявлення вагітності.

### 2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### ІФА метод рівноваги типу «Сендвіч» (Тип 2):

Необхідні реагенти для імуоферментного аналізу включають антитіла високої спорідненості і специфічності (сигнал і захоплення), з різним і чітким розпізнаванням епітопів, в надлишку, і нативний антиген. У цій процедурі калібратор, контроль або зразок пацієнта додають в лунки, покриті анти-ХГЛ. ХГЛ зразка зв'язується з анти-ХГЛ (МоAb) в лунках. Згодом фермент-мічені анти-ХГЛ додають в лунки. ХГЛ зі зразка утворює сендвіч між двома антитілами. Надлишок ферменту і зразка видаляють на стадії промивки. Взаємодія описується наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{(\text{m})}$  = Анти-ХГЛ (МоAb) (В лунках в надлишковій кількості)

$\text{Ag}_{(\text{hCG})}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{Enz}_{\text{Ab}(\text{hCG})}$  = ферментно-мічене  $\alpha$  ХГЛ (P) кози (надлишкова кількість)

$\text{Enz}_{\text{Ab}(\text{hCG})} \text{- Ag}_{(\text{hCG})} \text{- Ab}_{(\text{m})}$  = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи декілька різних сироваток з відомими значеннями антигену, крива доза-відповідь може бути згенерована, з якої встановлюється концентрація антигенів у невідомих зразках.

Відповідний субстрат додають в лунки, щоб генерувати колір різної інтенсивності в залежності від концентрації ХГЛ в лунках. Інтенсивність кольору у зразку може бути візуально порівняно з відомими калібраторами для отримання якісних результатів або розвиток кольору може бути прочитаний за допомогою мікропланшетного спектрофотометра для отримання напівкількісних результатів.

### 4. РЕАГЕНТИ

#### Матеріали, що постачаються:

#### А. Калібратори ХГЛ - 1 мл (мл)/флакон (ліофілізовані)

5 флаконів референсної сироватки для антигена ХГЛ з концентраціями 0 (A), 25 (B), 50 (C), 100 (D) і 250 (E) мМО/мл (mIU/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Розвести кожен флакон з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.

**Примітка:** Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні референсного препарату, аналізованого проти 3-го IS ВООЗ (75/537).

#### В. Ферментний Кон'югат анти-ХГЛ - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить фермент-мічене очищене антитіло до ХГЛ (IgG) кози в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### С. Планшет, покритий анти-ХГЛ - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий анти-ХГЛ і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### Д. Реагент Субстрату - 14 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### Е. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### Ф. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-30 °C (°C).

#### Г. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Зауваження 2:** Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25, 50 і 100 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Плівка або кришка для накривання планшета під час інкубації.
3. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm) (Тільки для напівкількісного визначення).
4. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
5. Таймер.
6. Контрольні матеріали.
7. Контейнери для забору сечі.

### 5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in-vitro  
Не для внутрішнього або зовнішнього використання  
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитися у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

### 6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

#### Зразки сироватки:

Зразками мають бути кров, сироватка різних типів, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки або плазми використовуйте центрифугу.

#### Зразки Сечі:

Зібрати зразки сечі в чисту ємність. Для найбільш точних результатів бажано зібрати перший зразок ранкової сечі.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.05 мл (мл) зразка.

## 7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти, якщо вони забруднені або є ріст бактерій.

## 9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте піпеткою по 25 мкл (μl) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (μl)) Ферментного Кон'югату ХГЛ.
4. Покрутіть мікропланшет обережно протягом 5-10 секунд для перемішування та інкубуйте протягом 10 хвилин при кімнатній температурі.
5. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантациа.
6. Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
7. Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

8. Інкубуйте 5 хвилин при кімнатній температурі.
9. Для **Якісних Результатів** див. розділ Інтерпретації Результатів.
10. Для **Напівкількісних Результатів** перейти до кроку 11 нижче.
11. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте.
12. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)).

**Примітка:** Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

## 10. РЕЗУЛЬТАТИ

### Якісні результати:

1. Не додавайте стоп-розчин в лунки. Блакитний колір набагато легше інтерпретувати, ніж жовтий колір, який з'являється після додавання стоп-розчину.
2. Порівняйте синій колір в лунці зі зразком з кольором в лунці, призначений для калібратора «В» (25 мМО/мл (mIU/ml)).
3. Якщо колір у лунці зі зразком менш інтенсивний, ніж колір в лунці з калібратором «В», зразок повинен вважатися **Негативним**, тому що він має концентрацію ХГЛ < 25 мМО/мл (mIU/ml) на момент відбору зразка.
4. Якщо колір у лунці зі зразком більш інтенсивний, ніж колір в лунці з калібратором «В», зразок повинен вважатися **Позитивним**, тому що він має концентрацію ХГЛ > 25 мМО/мл (mIU/ml) на момент відбору зразка.

## Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція при 450 нм (nm)	Результати	
			Напівкількісний, мМО/мл (mIU/ml)	Кількісний візуальний
Калібратор А	A1	0.029	0	
Калібратор В	B1	0.373	25	
Калібратор С	C1	0.646	50	
Калібратор D	D1	1.097	100	
Калібратор Е	E1	1.654	250	
Сироватка	F1	0.088	<b>4.3</b>	<b>Негативний</b>
Сеча	G1	0.661	<b>51.8</b>	<b>Позитивний</b>

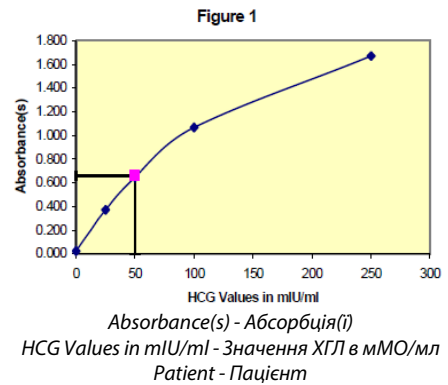
\*Візуальна інтерпретація (**Якісне визначення**) результатів основана на інтерпретації синього кольору перед зупинкою реакції зі стоп-розчином. Див. «Інтерпретація результатів».

\*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

### Напівкількісні Результати:

Для визначення концентрації ХГЛ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Відкласти абсорбцію для кожного стандарту сироватки проти відповідної концентрації ХГЛ в мМО/мл (mIU/ml) на міліметровому папері.
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Для визначення концентрації ХГЛ невідомого зразка, відкласти середню абсорбцію кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину з кривою і зчитати концентрацію (в мМО/мл (mIU/ml)) з горизонтальної осі графіка. (Див. Малюнок 1).
- 5.



**Примітка:** Програмне забезпечення, призначене для ІФА аналізів, може бути також використане для обробки даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, провести перевірку програмного забезпечення.

## 11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність (OD) калібратора «Е» має бути  $\geq 0.1$ .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

### 12.1. Якість роботи набору

1. Тест Monobind AccuBind™ Rapid ХГЛ Microwell ІФА призначений для використання раннього визначення вагітності і не повинен використовуватися для моніторингу подальшої вагітності. Для цієї мети використовувати Monobind AccuBind™ ХГЧ ІФА (Кат. № 825-300).
2. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
3. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.

- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Для напівкількісного визначення зразки пацієнтів з концентраціями ХГЛ вище 250 мМО/мл (mIU/ml) можуть бути розведені з нормальною чоловічою сироваткою (ХГЛ < 1 мМО/мл (mIU/ml)) або нормальною чоловічою сечею і повторно аналізовані. Концентрація зразка отримується множенням результату на коефіцієнт розведення.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

## 12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Помилкові позитивні результати можуть бути отримані в присутності широкого спектру трофобластичних і не трофобластичних пухлин, які секретують ХГЛ. Таким чином, можливість новоутворень, які секретують ХГЛ, повинна бути усунена до діагностики вагітності.
- Крім того, помилкові позитивні результати можуть бути отримані, коли аналізуються зразки від осіб, що приймають Pergonal\* і Clomid\*\*.
- При спонтанних мікро абортів і позаматковій вагітності отримуються значення, нижчі очікуваних під час нормальної вагітності, а високі значення часто спостерігаються при багатоплідних вагітностях (4, 5, 6).
- Після терапевтичного абортів, значення ХГЛ, які виявляються, можуть зберігатися три-чотири тижні. Швидкість зникнення ХГЛ після самовільного абортів буде змінюватись в залежності від кількості життєздатного залишкового трофобласта (4, 5, 6, 7).

\*Pergonal є зареєстрованим товарним знаком Serono Laboratories, Inc.

\*\*Clomid є зареєстрованим товарним знаком Merrell-National Laboratories.

## 13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Дослідження очевидно нормального дорослого (чоловіки і невагітні жінки) населення було проведено для визначення очікуваних значень для тестової системи Accubind™ Rapid ХГЛ ІФА Microplate. Дані показують, що зразок сироватки або сечі нормального здорового чоловіка або невагітної жінки має становити < 5.0 мМО/мл (mIU/ml).

Очікувані рівні ХГЛ під час нормальної вагітності наведені в таблиці 2.

**ТАБЛИЦЯ 2**  
**Очікувані значення для рівнів ХГЛ (3-ї IS 75/537) при нормальній вагітності (в мМО/мл (mIU/ml))**

1-й тиждень	10-30
2-й тиждень	30-100
3-й тиждень	100-1000
4-й тиждень	1000-10000
2-й і 3-й місяць	30000-100000
2-й триместр	10000-30000
3-й триместр	5000-15000

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватись на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

## 14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність набору ХГЛ всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контрольних сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблиці 3 і 4.

**ТАБЛИЦЯ 3**  
**Точність в аналізі (мМО/мл (mIU/ml))**

Взорець	N	x	σ	C.V., %
Пул 1	20	5.5	0.35	6.4
Пул 2	20	20.5	0.95	4.6
Пул 3	20	91.6	7.07	7.7

**ТАБЛИЦЯ 4**  
**Точність між аналізами\* (мМО/мл (mIU/ml))**

Взорець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	6.1	0.52	8.6
Рівень 2	10	22.3	1.63	7.3
Рівень 3	10	85.1	6.17	7.3

\*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

### 14.2 Чутливість

Чутливість аналізу становить 2.5 мМО/мл (mIU/ml).

### 14.3 Точність

Тестову систему Швидкий ХГЛ Accubind™ ІФА порівнювали з заявленим ІФА аналізом. Аналізувались біологічні зразки від нормальних і вагітних пацієнтів. Загальна кількість таких зразків становить 244. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для ХГЛ ІФА в порівнянні з референсним методом. Отримані дані представлені в таблиці 4.

**ТАБЛИЦЯ 4**

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	25.57	Y= 1.0135 +0.947 (X)	0.956
Метод порівняння	24.44		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референс-методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

### 14.4 Специфічність

Перехресна реактивність методу на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перехресна реактивність була розрахована шляхом виведення співвідношення між дозою додаткової речовини і дозою хоріонічного гонадотропіну, необхідного для отримання такого ж поглинання.

Субстанція	% Перехресної реактивності	Концентрація
Хоріонічний гонадотропін (ХГЛ)	1.0000	----
Субодиниця β-ХГЛ	< 0.001	1000 нг/мл (ng/ml)
Фолітропін (ФСГ)	< 0.001	1000 нг/мл (ng/ml)
Лютропін гормон (ЛГ)	< 0.001	1000 нг/мл (ng/ml)
Тиреотропін (ТТГ)	< 0.001	1000 нг/мл (ng/ml)

#### 14.5 Хук-Ефект

Дана тест-система виявляє зразки з концентраціями ХГЛ до 25000 мМО/мл (mIU/ml) як позитивно якісні.



#### ВИРОБНИК

MONOBIND INC.  
100 North Pointe Dr.  
Lake Forest, CA 92630 - USA  
Phone: 949.951.2665  
Fax: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)

МОНОБАЙНД ІНК  
100 Норд Поінт Драйв  
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США  
Тел.: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

