НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ХОРІОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ ЛЮДИНИ (ХГЛ), РОЗШИРЕНИЙ ДІАПАЗОН

8825-300, Human Chorionic Gonadotropin Extended Range (hCG-XR) Test System

Каталог. №: ***8825-300*** *Методика від* ***14-06-2013***
Кількість : ***96*** *Версія* ***0.1***
Виробник : ***Monobind Inc., (США)***

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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ
Кількісне визначення концентрації Хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ) в сироватці за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

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

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ
Імуноферментний аналіз (ТИП 3)
Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають **в надлишку** високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані моноклональні антитіла анти-hCG.
При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:

$$^{Enz}Ab_{(x\text{-}hCG)} + Ag_{hCG} + {}^{Btn}Ab_{(m)} \underset{k_{-a}}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} {}^{Enz}Ab_{(m)} - Ag_{hCG} - {}^{Btn}Ab_{(m)}$$

$^{Btn}Ab_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)
Ag_{hCG} = Нативний антиген (змінна кількість)
$^{Enz}Ab_{(x\text{-}hCG)}$ = ферментно-мічене полоклональне антитіло (надлишкова кількість)
$^{Enz}Ab_{(hCG)} - Ag_{HCG} - {}^{Btn}Ab_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло
k_a = Константа швидкості асоціації
k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

$$^{Enz}Ab_{(x\text{-}hCG)} - Ag_{hCG} - {}^{Btn}Ab_{(m)} + Стрептавідин_{c.w.} \Rightarrow \text{іммобілізований комплекс,}$$

$Стрептавідин_{c.w.}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки
Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4. РЕАГЕНТИ
Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори hCG-XR – 1 мл/флакон (ліофілізовані)
6 флаконів референтної сироватки для антигена hCG з концентраціями 0 (**A**), 5 (**B**), 25 (**C**), 100 (**D**), 250 (**E**) і 1000 (**F**) мМОд/мл. Розвести кожен флакон з 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води. Зберігати при 2-8 ° C.
Примітка: Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні еталонного препарату, який аналізували проти 3-го IS 75/537.

B. Ферментний Реагент hCG-XR – 13 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить ферментно-мічене очищенеантитіло, біотинильоване моноклональне IgG миші в буфері, з синім барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

C. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон
Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

E. Субстрат А - 7 мл/флакон
Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C**.**

F. Субстрат В - 7 мл/флакон
Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Стоп-розчин - 8 мл/флакон
Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.
Зауваження 2: уникати впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C.
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 з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка бутилка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

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, HCV 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, HHS.

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

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ
Зразками мають бути кров, сироватка різних типів, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венопункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період

до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролі 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

1. **Промивний буфер**
   Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.
2. **Робочий Субстратний розчин – стабільний протягом одного року**
   Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.
Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).
Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом

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.**
2. Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту hCG-XR в кожну лунку.
4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.
5. Інкубувати протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
7. Додайте 350 мкл 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 гнучка бутилка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
8. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку. **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
9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

10. РЕЗУЛЬТАТИ

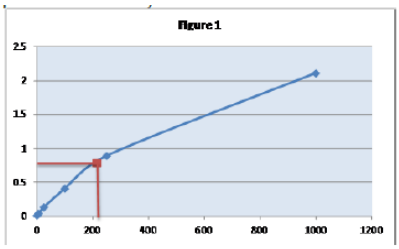
Для визначення концентрації hCG в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації hCG в мМОд/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації hCG в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.789 перетинає стандартну криву при 214.81 мМОд/мл (див. мал.1)

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація мМОд/мл
Калібратор А	A1	0.011	0.011	0
	B1	0.011		
Калібратор В	C1	0.044	0.043	5
	D1	0.042		
Калібратор С	E1	0.139	0.136	25
	F1	0.132		
Калібратор D	G1	0.413	0.411	100
	H1	0.409		
Калібратор Е	A2	0.888	0.894	250
	B2	0.899		
Калібратор F	C2	2.100	2.112	1000
	D2	2.125		
Зразок	E2	0.801	0.789	**214.81**
	F2	0.777		

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



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібратора F повинна бути ≥ 1.3.
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентраціями hCG вище 1000 мМОд/мл можуть бути розведені з нормальною чоловічою сироваткою (hCG < 1 мМОд/мл) і повторно аналізовані. Концентрація зразка отримується шляхом множення отриманого результату на коефіцієнт розведення.
10. 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.

11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. 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.
13. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. ***Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.***
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ELISA були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. 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.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Помилкові позитивні результати можуть виникати в присутності широкого спектру трофобластичних і не трофобластичних пухлин, які секретують ХГЛ. Тому, ймовірності секретуючих новоутворень ХГЛ повинні бути усунені до діагностики вагітності.
8. Крім того, помилкові позитивні результати можуть бути отримані, коли аналізуються зразки від осіб, що приймають *Pergonal** і *Clomid***.
9. При спонтанних мікроабортах і позаматковій вагітності отримуються значення, нижчі очікуваних під час нормальної вагітності, а високі значення часто спостерігаються при багатоплідних вагітностях.
10. Після терапевтичного аборту, значення ХГЛ, які виявляються, можуть зберігатися три-чотири тижні. Швидкість зникнення ХГЛ після самовільного аборту буде змінюватись в залежності від кількості життєздатного залишкового трофобласта.
11. **Значення ХГЛ само по собі не є діагностичним значенням** і повинно бути використано тільки в поєднанні з іншими клінічними проявами (спостереженнями) і діагностичними процедурами.

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

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

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Вивчення нормального дорослого населення було проведено для визначення очікуваних значень для тестової системи AccuBind® ELISA ХГЛ-XR. Середні значення (X), стандартні відхилення (σ) і очікувані діапазони (± 2 σ) представлені в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи AccuBind® ІФА hCG-XR (В мМОд/мл – 3-ій IS 75/537)

Number	25
Mean	2.9
Standard Deviation	1.4
Expected Ranges (±2σ)	0.1 - 5.7

Очікувані рівні ХГЛ при нормальній вагітності наведені в таблиці 2.

ТАБЛИЦЯ 2

Очікувані значення для для рівнів ХГЛ (3-ій IS 75/537) під час нормальної вагітності (в мМОд/мл)

1st week	10 - 30
2nd week	30 - 100
3rd week	100 - 1000
4th week	1,000 -10,000
2nd & 3rd month	30,000 - 100,000
2nd trimester	10,000 - 30,000
3rd trimester	5,000 - 15,000

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 hCG-XS 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.

ТАБЛИЦЯ 3

Точність в аналізі (мМОд/мл)

Взірець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	24	6.375	0.284	4.2
Рівень 2	24	21.041	0.519	2.5
Рівень 3	24	401.432	10.509	2.6

14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється при визначенні варіабельності 0 мМОд/мл калібратора сироватки і з використанням 2σ (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Дана система має чутливість 0.0084 мМОд/лунку. Це еквівалентно пробі, що містить 0.332 мМОд/мл ХГЛ.

14.3 Точність

Тест-систему ІФА hCG-XR AccuBind® порівнювали з референтним методом. Були використані зразки нормального населення і вагітних жінок. Загальна кількість таких зразків становить 110. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 3

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	14.8	Y= 0.081 + 0.93 (X)	0.989
Метод порівняння	15.1		

Тільки незначні розбіжності між даним аналізом і еталонним методом свідчать про близькість середніх значень. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресної реактивності не було виявлено з використанням тестової системи HCG-XS AccuBind® ELISA при додаванні великої кількості наступних речовин в об'єднану сироватку людини.

Substance	Cross Reactivity	Concentration
Chorionic Gonadotropin (hCG)	1.0000	----
β-hCG subunit	< 0.0001	1000ng/ml
Follitropin (FSH)	< 0.0001	1000ng/ml
Lutropin Hormone (LH)	< 0.0001	1000ng/ml
hrotropin (TSH)	< 0.0001	1000ng/ml

Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com

УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»