



**Набор ИФА**  
**для количественного определения**  
**интактного хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в сыворотке или плазме**

**Кат. номер** : EIA-1469  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DRG (Германия)

*Методика от 06-2008*  
*Версия 6.0*

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

### 1. ВВЕДЕНИЕ

DRG ХГЧ набор иммуноферментного анализа содержит материалы для количественного определения интактного хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в сыворотке или плазме. Данный анализ предназначен ТОЛЬКО для диагностического использования in vitro.

Хорионический гонадотропин (ХГЧ) – гликопротеиновый гормон, который обычно производится плацентой во время беременности. После зачатия концентрация ХГЧ резко возрастает и достигает наивысшего уровня в конце первых трех месяцев. Высокие концентрации наблюдаются на протяжении всей беременности. После родов концентрация ХГЧ резко падает и становится неопределяемой через несколько дней.

Структурно интактные молекулы ХГЧ состоят из  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц с молекулярным весом 38.4 kDa.  $\alpha$ -субъединица практически идентична  $\alpha$ -субъединицам других гликопротеиновых гормонов, таких как ТСГ, ЛГ, ФСГ. Биологическая специфичность и иммунохимические различия данных гормонов определяются спецификой  $\beta$ -субъединицы.

Моноклональные антитела, определяющие характерные области в  $\beta$ -цепочке молекулы ХГЧ, важны для дифференциации между ХГЧ и ТСГ, ЛГ, ФСГ.

Специальные тесты для определения ХГЧ позволяют определять беременность на ранних сроках.

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

DRG HCG ELISA набор – твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), основанный на принципе сэндвича.

Микротитровальные лунки покрываются моноклональным антителом, направленным на особую область антигенов на молекуле ХГЧ. Аликвот образца пациента, содержащий эндогенный ХГЧ, инкубируется в лунке, покрытой ферментным конъюгатом, который является моноклональным антителом, направленным против  $\alpha$ -цепочки ХГЧ, конъюгированной пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат вымывается. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации ХГЧ в образце. После добавления раствора субстрата образуется цвет. Интенсивность которого пропорциональна концентрации ХГЧ в образце пациента.

### 3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Данный набор предназначен только для использования в диагностике in vitro.
2. За информацией по опасным веществам, входящим в состав набора, обращайтесь к Паспорту безопасности материала.
3. Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2, поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
4. Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
5. Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
6. Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
7. Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
8. Обращение с набором должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
9. Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
10. Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
11. Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
12. Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
13. За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

### 4. РЕАГЕНТЫ

#### 4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (разделенных) полосок; 96 лунок.

Лунки покрыты анти-бета-ХГЧ антителом (моноклональным).

2. **Стандарт (Стандарт 1-5)**, 5 флаконов (лиофилизированных), 1,0 мл;

Концентрации: 5; 50; 200; 500; 1000 мМЕ/мл

Конверсия: 1пг/мл = 0,00916 мМЕ/мл

\*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.

3. **Разбавитель образца**, 1 флакон, 10мл, готовый к использ., 0 мМЕ/мл

\*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.

4. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 11 мл, готовый к использованию. Моноклональное антитело против альфа-субъединицы конъюгированное с пероксидазой хрена;

\*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.

5. **Раствор Субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использ., ТМБ.

6. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использ., содержит 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Избегайте контакта с раствором, поскольку это может привести к раздражению кожи и ожогам.

\*BND = 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан

\* MIT = 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

**Примечание:** Дополнительно разбавитель образца предоставляется по запросу.

#### 4.2 Требуемые, но не поставляемое оборудование и материалы

- Микротитровальный планшетный откалиброванный считыватель (450 +/- 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер
- Полулогарифмическая миллиметровочная бумага или ПО для обработки данных.

#### 4.3 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2 – 8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2 – 8°C. После вскрытия пакета из фольги, необходимо его плотно закрывать.

#### 4.4 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо привести все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.

##### **Стандарты**

Развести содержимое флакона лиофилизированного стандарта 1,0 мл дистиллированной воды.

**Примечание:** разведенные стандарты стабильны в течении 2 месяцев при 2 + 8 °С. При более длительном хранении заморозить до - 20°C.

#### 4.5 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в оригинале инструкции).

#### 4.6 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

### 5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном анализе может использоваться сыворотка или плазма (ЭДТА, гепариновая или цитратная плазма)

Не использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

**Примите во внимание:** Образцы, содержащие азид натрия не должны использоваться в данном анализе.

#### 5.1 Сбор образцов

##### **Сыворотка:**

Собрать кровь венепункцией (наприм., Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать пока не произошло полное свертывание. Для пациентов, проходящих антикоагуляционную терапию может потребоваться больше времени для свертывания.

##### **Плазма:**

Цельную кровь необходимо собрать в пробирки для центрифугирования, содержащие антикоагулянт и центрифугировать сразу после забора.

(Например, для ЭДТА плазмы Sarstedt Monovette – красная крышка - # 02.166.001;

для гепариновой плазмы Sarstedt Monovette – оранжевая крышка - # 02.165.001;

для цитратной плазмы Sarstedt Monovette – зеленая крышка - # 02.167.001).

#### 5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрытыми, и могут храниться до 5 дней при температуре 2-8°C до начала анализа. Образцы при хранении в течении более длительного периода и должны быть заморожены перед анализом только раз до -20°C. Размороженные образцы необходимо несколько раз перевернуть перед анализом.

#### 5.3 Разведение образцов

Если в первичном анализе оказалось, что концентрация образца выше самого высокого стандарта, образец может быть разбавлен разбавителем образца и повторно проанализирован как описано в процедуре анализа.

Для вычисления концентраций необходимо принять во внимание данный коэффициент разбавления.

##### **Пример:**

а) разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл разбавителя образца (тщательно перемешать);

в) разбавление 1:100: 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл разбавителя образца (тщательно перемешать).

**Примечание:** Сыворотки беременных женщин перед анализом необходимо разбавлять 1/100 разбавителем образца.

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие замечания

- Перед исследованием все реагенты и образцы должны иметь комнатную температуру. Все реагенты перемешивать без образования пены.
- После начала теста все этапы должны быть завершены без перерывов.
- Для каждой пробы использовать новые одноразовые наконечники пипеток.
- Абсорбция исходит из времени инкубации и температуры. До начала анализа рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить требуемое количество лунок, и т.д., чтобы пройти все этапы анализа без остановок.
- Как правило ферментная реакция прямо пропорциональна времени и температуре.

#### 6.2 Процедура анализа (Количественный метод)

Каждая процедура должна содержать стандартную кривую.

**Примечание:** Сыворотки беременных женщин перед анализом необходимо разбавлять 1/100 разбавителем образца (см. 5.3).

1. Установите в держателе требуемое число лунок.
2. Раскапайте по **25 мкл** каждого стандарта, контроля и образца сыворотки **новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки.
3. Раскапайте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку. Тщательно перемешайте в течение 10 секунд. Важно полностью перемешать реагенты.
4. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
5. Резко вытряхнуть содержимое лунок, **5 раз** промыть лунки дистиллированной водой (400 мкл/лунку). Резко постучать лунками по промокательной бумаге чтобы удалить остатки жидкости.

**Важное замечание:**

Чувствительность и точность данного анализа в большей мере зависит от правильности процедуры промывания!

6. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубировать **10 минут** при комнатной температуре.
8. Остановить ферментативную реакцию добавлением 50 мкл Стоп-раствора в каждую лунку.
9. Считать оптическую плотность при **450±10 нм** на микропланшетном считывателе в **течении 10 минут** после добавления стоп раствора.

### 6.3 Процедура анализа (Качественный метод)

Данная процедура дифференцирует положительные (беременность) и отрицательные образцы сравнением уровней ХГЧ в образцах с Разбавителем Образца (0 мМЕ/мл) и Стандартом 2 (50 мМЕ/мл).

Делается параллельная постановка образцов пациентов с разбавителем образца (0 мМЕ/мл) и 50 мМЕ/мл Стандартом 2. Процедура анализа идентична количественному методу, но п. 9 и 10 исключаются.

### 6.4 Подсчет результатов (количественный)

1. Подсчитать средние величины абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациентов.
2. Построить стандартную кривую на пересечении средней величины абсорбции, полученной в результате соотношения референс-стандарта и его концентрации с величиной абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрации на горизонтальной (X) оси.
3. Используя среднюю величину абсорбции для каждого образца, определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: Результат в данной инструкции был вычислен автоматически при использовании 4-параметровой логистической кривой. 4-параметровая логистика – желаемый метод. Другие функции обработки данных могут дать немного другие результаты.
5. Концентрацию образцов можно считать непосредственно из калибровочной кривой. Образцы с концентрацией более чем самый высокий стандарт необходимо дальше разбавить или фиксироваться как > 1000 мМЕ/мл. При вычислении концентраций необходимо учитывать данный коэффициент разбавления.

#### 6.4.1 Пример типичной калибровочной кривой

Следующие данные представлены только в демонстрационных целях и **не могут** быть использованы вместо данных, полученных во время анализа.

Стандарт	Оптические единицы (450 нм)
Стандарт 1 (5 мМЕ/мл)	0,05
Стандарт 2 (50 мМЕ/мл)	0,14
Стандарт 3 (200 мМЕ/мл)	0,43
Стандарт 4 (500 мМЕ/мл)	0,94
Стандарт 5 (1000 мМЕ/мл)	1,54

### 6.5 Качественные результаты

Для качественного анализа уровня ХГЧ окрашивание образца сравнивается с цветом 0 и 50 мМЕ/мл стандартов.

Если интенсивность голубого цвета меньше, чем у 50 мМЕ/мл референс-стандарта, образец считается отрицательным.

Если насыщенность голубого цвета выше или равна цвету 50 мМЕ/мл стандарта, образец считается положительным.

## 7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ НОРМА

### 7.1 Уровень ХГЧ в норме в здоровых взрослых, небеременных:

Пол	Возраст	Количество	ХГЧ (мМЕ/мл)
Мужчины	< 50	40	<5
	> 50	10	<5
Женщины	< 50	42	<5
	> 50	7	<5

### 7.2 Уровни нормы ХГЧ в сыворотке во время беременности

Неделя беременности	Концентрация мМЕ/мл	Неделя беременности	Концентрация мМЕ/мл
2.-3.	10 - 50	13.	12500 -95000
4.	40 - 1000	14.	10500 -80000
5.	400 - 20700	15.	9000 -70000
6.	2200 - 74200	16.	7000 -64000
7.	6000 - 130000	17.	5500 -56000
8.	2900 - 190000	18.	4500 -50000
9.	18500 - 205000	19.	3300 -40000
10.	18000 - 200000	20.	2500 -32000
11.	16500 - 180000	21.	1800 -25000
12.	14500 - 125000		

В течение первых шести недель беременности, концентрации сыворотки ХГЧ имеют увеличиваются в два раза приблизительно через 2 дня. После родов, уровни ХГЧ падают быстро и исчезают полностью через нескольких дней. Очень низкие уровни ХГЧ могут присутствовать при эктопических беременностях, в то время как состояния подобно хориокарциноме, трофобластическим или нетрофобластическим новообразованиям или гитатидным заносам могут приводить к очень высоким концентрациям ХГЧ.

### ВНИМАНИЕ

1. Для установления беременности по сыворотке количественное исследование производится с пределом 50 мМЕ/мл. Отрицательные или граничные результаты должны быть подтверждены повторным исследованием свежих образцов.
2. Отмечено, что иммунологические тесты на беременность могут дать ложные результаты в случаях некоторых заболеваний, как, например, ревматоидный артрит, а также вследствие приема некоторых медикаментов. В таких случаях необходимо особенно внимательно интерпретировать результаты теста.

**8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

По правилам лабораторной практики контроля ставятся с каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть поставлено для установления средних величин и приемлемых пределов, чтобы обеспечить правильность выполнения.

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно местному законодательству. Использование контрольных образцов рекомендуется для подтверждения достоверности результатов каждый день. Используйте контроли здоровых и патологических уровней.

Также рекомендуется заимствовать информацию из национальных или международных программ Подтверждения качества, для того чтобы быть уверенным в точности результатов.

Если результаты анализа вне принятых уровней контрольных материалов, их нужно считать не действительными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующее: оборудование для раскапывания и установки времени; фотометр; даты истечения срока годности реагентов, условия хранения и инкубации; методы аспирации и промывания.

После проверки выше указанного и в случае если ошибка не была обнаружена, свяжитесь со своим дистрибьютором или производителем.

**9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****9.1 Динамический диапазон анализа**

Находиться в пределах между 5 – 1000 мМЕ/мл.

**9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)**

Следующие вещества были проверены на перекрестную реакцию в анализе:

Протеин	Концентрация	Интенсивность цветообразования эквивалентна уровню ХГЧ в сыворотке
ЧЛГ	300 мМЕ/мл	9
ЧЛГ	200 мМЕ/мл	< 5
ЧЛГ	80 мМЕ/мл	< 5
ТСГ	75 мклМ/мл	10
ТСГ	50 мклМ/мл	6
ТСГ	25 мклМ/мл	< 5
ФСГ	200 мклМ/мл	< 5
ФСГ	50 мклМ/мл	< 5

**9.3 Чувствительность**

Аналитическая чувствительность определялась из среднего показателя плюс двух стандартных отклонений 20 факторных экспериментов Разбавителя Образца, который составляет < 5 мМЕ/мл.

**9.4 Воспроизводимость****9.4.1 В пределах анализа**

Вариативность в пределах анализа:

Образец	К-во	Среднее (мМЕ/мл)	КВ (%)
1	20	250,4	4,7
2	20	176,9	2,2
3	20	86,6	3,5

Вариативность между анализами:

Образец	К-во	Среднее (мМЕ/мл)	КВ (%)
1	20	246	4,3
2	20	174	4,0
3	20	87	3,3

**9.5 Восстанавливаемость**

Образцы были насыщены ХГЧ раствором в соотношении 1:1. Ожидаемые значения были определены добавлением половины значений, определенных в неразбавленных образцах, и половины значений известных растворов. Процент восстанавливаемости определен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Добавляемая конц-ция 1:1 (фл./фл.) мМЕ/мл	Измеряемая конц-ция (мМЕ/мл)	Ожидаемая конц-ция (мМЕ/мл)	Восстанавливаемость %
1	-	14,1	14,1	100
	50	35,6	32,05	111
	30	21	22,05	95
	25	19	19,55	97
2	-	268	268	100
	50	149	159	94
	200	231	234	99
	500	408	384	106
3	-	79	79	100
	50	61	64,5	95
	100	83	89,5	93
	200	139	139,5	100

**9.6 Линейность**

Образец	Разбавление	Средняя конц-ция (мМЕ/мл)	Восстанавливаемость %
---------	-------------	---------------------------	-----------------------

1	-	634	-
	1:2	278	88
	1:4	136,2	86
	1:8	71,4	90
	1:16	38,1	96
2	-	613	-
	1:2	276	90
	1:4	131,2	86
	1:8	71,6	93
	1:16	38,1	99
3	-	242	-
	1:2	123	102
	1:4	57	94
	1:8	31	102
	1:16	16,1	106

#### 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены только при четком следовании инструкции к набору и применением всех правил, принятых в лабораторной практике. Любое неправильное использование образцов или изменение этого результата может повлиять на результаты.

##### 10.1 Перекрестно реагирующие вещества

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

##### 10.2 Влияние лекарств

Не сегодняшний день не обнаружено.

**10.3 «Хук эффект» высокой дозы** был обнаружен в этом анализе до 13,300 мМЕ/мл ХГЧ.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)