* Плацентарный лактоген ИФА

 EIA-1283

 96 лунок

**Внимание!!!**

**По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.**

# ВВЕДЕНИЕ

## Наименование и назначение

Иммуноферментный анализ для количественного in vitro определения плацентарного лактогена (ПЛ) человека в сыворотке.

## Описание и объяснение теста

Физиологическая роль ПЛ пока еще не выяснена, но огромное сходство с гормоном роста породило гипотезу про то, что ПЛ выступает в качестве регулятора фето-плацентарного роста и других физиологических изменений во время беременности. Предполагается, что уровень этого гормона в сыворотке матери может отражать так называемый «индекс плацентарной функции». Пониженные уровни ПЛ рассматриваются как внутриутробная гибель плода, болезненные для плода роды и асфиксия новорожденных. Это подтверждается особенно, когда снижения уровня повторяются в процессе наблюдения, вызывая хроническое состояние плацентарного и, как следствие, эмбрионального компромисса. Снижения уровня не происходит, если беременность проходит без каких-либо событий, спокойно весь срок. Повышенные уровни обычно показывают оптимальный исход при беременности единственным ребенком. Однако повышения уровня могут показывать важные патологии плода при специфических заболеваниях, а именно: сахарный диабет, эмбриональная макросомия, резус изоиммунизация, гидрамнион.

# ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор для иммуноферментного анализа плацентарный лактоген компании ДРГ - это твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на принципе «сендвича».

Микротитровальные лунки покрыты моноклональными (мышиными) антителами, направленными против уникального антигенного сайта на молекуле ПЛ. Аликвота пробы пациента с эндогенным ПЛ инкубируется в лунке с ферментным конъюгатом, который из себя представляет анти-ПЛ антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена. После инкубации несвязавшийся конъюгат вымывается.

Количество связавшейся пероксидазы пропорционально концентрации ПЛ в образце. При добавлении субстратного раствора появляется окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации ПЛ в пробе пациента.

#  ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования.
2. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
3. **Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно, сравните английскую инструкцию с русской, отдавая предпочтение английской и обращая особое внимание на состав набора и процедуру анализа. Убедитесь, что вам все понятно.**
4. Микротитровальный планшет содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и

с одинаковыми временными интервалами.

1. Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, т.к. это может привести к контаминации реагентов.
2. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
3. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
4. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26ºС). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
5. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
6. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
7. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
8. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
9. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
10. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
11. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
12. Избегайте контакта со стоп раствором – 0,5M H2SO4*.* Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
13. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
14. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
15. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизованы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
16. Информацию об опасных регентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

# РЕАГЕНТЫ

## Реагенты, поставляемые с набором:

1. **Микротитровальный планшет** 96 лунок, 12х8 (делимых) стрипов,

покрыты анти-ПЛ антителами (моноклональными).

1. **Стандарты( 1-4)** 4 флакона по 0,5 мл каждый, готовы к использованию, Концентрации: 1,25 – 5 – 10 - 20 мг/л; Коэффициент пересчета 1 мг/л = 1 мМЕ/л. *Стандарты откалиброваны по международному стандарту NIBSC для ПЛ, IRP (73/545).*

Содержит безртутный консервант

1. **Нулевой стандарт** (он же раствор для разведения образцов)

1 флакон, 90 мл, готов к использованию,

0 мг/л,

содержит безртутный консервант.

1. **Контроли (Низкий и Высокий)** 2 флакона, 0,5 мл. каждый, готовы к использованию. Контрольные значения указаны на флаконе или на листе Контроля Качества.

Содержит безртутный консервант.

1. **Ферментный конъюгат** 1 флакон, 11 мл, готов к использованию,

анти-ПЛ антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена,

содержит безртутный консервант.

1. **Субстрат-раствор** 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
2. **Стоп-раствор** 1 флакон, 14 мл, готов к использованию,

0,5 М H2SO4.

*Избегать контакта со стоп-раствором. Вызывает раздражение и ожоги!*

**Внимание:** дополнительный Нулевой Стандарт для разведения образцов пациентов доступен по запросу.

##  Необходимые материалы, не входящие в набор

* Микротитровальный ридер (450±10нм) (например, DRG Instruments Microtiterplate Reader)
* Калибровочные микропипетки различного объема
* Абсорбирующая бумага
* Дистиллированная или деионизированная вода
* Таймер
* Пробирки для разведения образцов (12 х 75 мм)
* Бумага для построения калибровочной кривой или программное обеспечение для обработки данных.

## Хранение и стабильность реагентов

При хранении при 2° ÷ 8°C невскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Открытые реагенты хранить при 2° ÷ 8°C . Микротитровальные лунки хранить при 2° ÷ 8° C. После использования части лунок необходимо хранить оставшиеся лунки в герметично закрытой упаковке. Иммунореактивность лунок сохраняется 6 недель в плотно закрытой упаковке с влагопоглотителем и при условиях хранения, описанных выше.

## Приготовление реагентов

Перед использованием доведите все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

## Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности.

## Повреждение Набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, ДРГ должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

# ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В этом исследовании может использоваться сыворотка.

Не использовать гемолизированные, желтушные и липемические образцы.

*Обратите внимание:* образцы, содержащие азид натрия, не могут использоваться с этим набором.

## Забор образцов

**Сыворотка:**

Собрать кровь венопункцией, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

## Хранение и Подготовка образцов

Образцы, закрытые крышками, могут храниться до 5 дней при 2 – 8 ˚С перед исследованием.

В случае более длительного промежутка времени до исследования образцы должны храниться при-20°C. Перед исследованием размороженные образцы следует несколько раз перевернуть.

## Разведение образцов

Перед началом анализа образцы должны быть **предварительно разведены 1:100 Нулевым Стандартом**.

1. Внесите в пробирку по 1 мл. Нулевого стандарта для каждого образца.
2. Добавьте 10 мкл. каждого образца в соответствующую пробирку. Перемешивайте в течение 10 сек. с помощью вортекса (избегайте вспенивания)

**Контроли, вложенные в набор (Низкий и Высокий), поставляются в готовом для использования виде. Их не нужно разводить.**

**Внешние контроли (такие как контроли Bio-Rad) необходимо разводить также как и образцы.**

Если во время начального анализа обнаружили, что концентрация образца выше самого высокого стандарта, образец необходимо развести Нулевым Стандартом, и исследовать повторно согласно Процедуре Анализа.

Для расчета концентрации необходимо учитывать фактор разведения.

# ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

## Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры. Все реагенты должны быть смешаны без образования пены

- После начала процедуры, все шаги должны быть проведены без остановки.

- Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для дозатора для каждого стандарта, контроля и образца для предотвращения контаминации.

- Поглощение - это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять все крышки и закрепить необходимое количество стрипов в держателе. Это позволит придерживаться одинакового времени между пипетированием.

- Согласно общему правилу ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

## Процедура анализа

**Замечание по процедуре:**

Ручное пипетирование: Рекомендуется использовать не больше 32 лунок для проведения одной серии анализов. Пипетирование всех образцов, стандартов и контролей должно быть завершено в течение 3 минут.

Автоматическое пипетирование: Возможно использование всего планшета из 96 лунок. Тем не менее, рекомендуется завершить пипетирование всех стандартов, образцов и контролей в течение 3 минут.

Необходимо строить калибровочную кривую для каждой постановки.

1. Закрепить желаемое количество лунок/стрипов в держателе.
2. Внести **10 мкл стандартов, контролей и предварительно разведенных образцов** новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
3. Добавить **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. Важно добиться полного смешивания на этом этапе.
4. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
5. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **5 раз** дистиллированной водой (300 мкл на лунку). Выстучать оставшиеся капли на абсорбирующую бумагу.

**Важно:** Чувствительность и точность этого анализа зависят от правильности проведения промывки!

1. Добавить **100 мкл cубстрат-раствора** в каждую лунку.
2. Инкубировать **10 минут** при комнатной температуре.
3. Остановить ферментную реакцию, добавив **50 мкл стоп-раствора** в каждую лунку.
4. Считать абсорбцию (OП) при 450±10 нм при помощи ридера для микротитровальных панелей.

Рекомендуется считывать результаты в течение **10 минут** после добавления cтоп-раствора.

##  Подсчет результатов

1. Рассчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Построить стандартную кривую: отложить значения абсорбции каждого стандарта напротив их концентраций, абсорбции - на оси Y, концентрации - на оси X.
3. Используя среднее значение абсорбции образцов пациентов определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты данной инструкции были посчитаны с использованием подгонки кривой по 4-параметрической логистической функции (4 PL).

Предпочтительные методы:4 -Parameter Rodbard или 4 Parameter Marquardt. Другие методы обработки данных могут дать отличный (от данного) результат.

1. Концентрации образцов можно считать прямо с данной стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем максимальный стандарт, необходимо разбавить или обозначить концентрацию как > 20 мг/л. При подсчете результатов необходимо учитывать кратность разведения.

### Пример стандартной кривой

Следующие данные приведены только для демонстрации и не могут использоваться для получения результатов во время анализа.

|  |  |
| --- | --- |
| **Стандарт** | **Оптические Единицы (450 нм)** |
| Нулевой стандарт (0 мг/л) | 0,03 |
| Стандарт 1 (1,25 мг/л) | 0,17 |
| Стандарт 2 (5,0 мг/л) | 0,65 |
| Стандарт 3 (10,0 мг/л) | 1,71 |
| Стандарт 4 (20,0 мг/л) | 1,84 |

# ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные и ненормальные значения.

В исследовании, проведенном на нормальных здоровых взрослых людях, используя набор DRG Плацентарный лактоген, были получены следующие данные:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Диагностика беременности** | **Одноплодная беременность**  |  |
| **10-12 неделя** | **0,05-1,00 мг/л** |  |
| **12-14 неделя** | **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** |  |

\*Пример:

Если пациентка в первой половине беременности, пожалуйста, смотрите диапазон для недель 10-12. Если пациентка во второй половине беременности, пожалуйста, смотрите диапазон для недель 12 -14.

Результаты анализа не могут быть единственной причиной терапевтического заключения. Результат должен коррелировать с другими клиническими исследованиями и диагностическими тестами.

# КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

* Лабораторная практика требует, чтобы контроль ставили для каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализировано, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории.
* Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами.
* Постановка контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов.
* Ставьте контроли с нормальными и патологическими уровнями.
* Контроли и соответствующие им результаты, полученные Лабораторией Контроля Качества, указаны в Паспорте Качества, приложенном к набору. Значения и диапазоны, указанные на листе КК всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.
* Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.
Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными.
В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы промывки.
* После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

# Характеристики анализа

## Динамический диапазон исследования

Рабочий диапазон лежит в районе значений 0,04 – 20 мг/л.

## Специфичность антител (кросс-реактивность)

Следующие вещества были проверены на кросс-реакцию.

|  |  |
| --- | --- |
| Антиген | Эквивалент ПЛ |
| ХГЧ 2000 МЕ/л | не определяется |
| АФП 300 МЕ/л | не определяется |
| СТГ 100 мкг/л | не определяется |
| Пролактин 200 мкг/л | не определяется |

## Чувствительность

Аналитическая чувствительность была подсчитана с помощью среднего значения + 2 стандартных отклонения двадцати повторных анализов нулевого стандарта и составила 0,043 мг/л.

## Воспроизведение

### Интра-анализ

Вариабельность внутри одной постановки:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Образец | Кол-во | Среднее (мг/л) | КВ % |
| 1 | 18 | 0,66 | 6,06 |
| 2 | 18 | 2,34 | 5,55 |
| 3 | 18 | 6,24 | 6,73 |

КВ – коэффициент вариации

### Интер-анализ

Вариабельность между постановками:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Образец | Кол-во | Среднее (мг/л) | КВ % |
| 1 | 39 | 0,68 | 8,82 |
| 2 | 24 | 2,52 | 7,14 |
| 3 | 24 | 6,87 | 5,67 |

## Восстановление

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Образец** | **Добавленные концентрации** | **Ожидаемые концентрации** | **Наблюдаемые концентрации** | **Восстановление** |
|  | **мг/л** | **мг/л** | **мг/л** | **%** |
| 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 |
| 10,0 | 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 |
| 10,0 | 9,81 | 10,96 | 89,5 |
| 3 | 0,00 | 4,67 |  |  |
| 0,63 | 2,56 | 2,96 | 86,40 |
| 2,50 | 4,46 | 4,83 | 92,30 |
| 5,00 | 6,69 | 7,33 | 91,20 |
| 10,0 | 11,66 | 12,33 | 94,50 |

##  Линейность

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Образец №** | **Разведение** | **Наблюдаемые концентрации** | **Ожидаемые концентрации** | **Восстановление** |
|  |  | **мг/л** | **мг/л** | **%** |
| 1 | нет | 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 | нет | 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 |

#  ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены, если процедура осуществляется с полным пониманием приложенной инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики.
Любое неправильное обращение с образцами или модификация данного теста могут повлиять на результаты.

## Интерферирующие вещества

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

## Влияние медикаментов

На сегодняшний день неизвестны медикаменты, которые имеют влияние на измерение плацентарного лактогена в образце.

##  Хук-Эффект

В этом анализе хук-эффект не обнаружен при тестировании образцов с концентрацией до 700 мг/л.

# ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

##  Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.
Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

##  Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат - часть общей клинической картины пациента.
Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение.
Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

##  Ответственность

Любое изменение набора и / или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно.
Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны.

Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственность производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.