

# 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 2-8<sup>0</sup>С не вскрытые реагенты сохраняют свою активность до окончания срока годности. Не используйте реагенты по истечению срока годности.

Все вскрытые реагенты должны храниться при 2-8<sup>0</sup>С. Микропланшет необходимо хранить при 2-8<sup>0</sup>С. 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 анализата.

% 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)