

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ИНТАКТНОГО ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА (ХГЧ)
В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

EIA-1469, HCG ELISA

Каталог. № : **EIA-1469**
Количество : **96**
Производитель: **DRG (Германия)**

Методика от **08-2014**
Версия **7.0**



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

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 α и β субъединиц с молекулярным весом 38.4 kDa. α -субъединица практически идентична α -субъединицам других гликопротеиновых гормонов, таких как ТСГ, ЛГ, ФСГ. Биологическая специфичность и иммунохимические различия данных гормонов определяются спецификой β -субъединицы.

Моноклональные антитела, определяющие характерные области в β -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 α -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. 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 and 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. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
4. Микротитровальная плашка 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.
6. 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 в флаконы, тк это может привести к контаминации реагентов.
7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
12. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
16. 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.
17. Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCL .Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на кожу и слизистые. 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.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных регентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в DRG.

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 мМЕд/мл
Конверсия: 1пг/мл = 0,00916 мМЕд/мл
*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.
3. **Разбавитель образца**, 1 флакон, 10 мл, готовый к использованию, 0 мМЕд/мл
Содержит нертутный консервант.
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 использованию, ТМБ.
6. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию, содержит 0.5M H₂SO₄. Избегайте контакта с раствором, поскольку это может привести к раздражению кожи и ожогам.

*BND = 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан

* MIT = 2-метил-2H-изотиазол-3-один

Примечание: Дополнительно разбавитель образца предоставляется по запросу.

4.2 Требуемые, но не поставяемое оборудование и материалы

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

4.3 Хранение и стабильность набора

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

Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8 °С. Микротитровальные лунки должны храниться при 2- 8 °С. 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 °С.

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 (например, 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 °С до начала анализа. Образцы при хранении в течении более длительного периода и должны быть заморожены перед анализом только раз до -20 °С. 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 остановки.
- 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 промокатальной 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 **течение 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 мМЕд/мл) и Стандартом 2 (50 мМЕд/мл).

Делается параллельная постановка образцов пациентов с разбавителем образца (0 мМЕд/мл) и 50 мМЕд/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-параметровочной логистической кривой. 4-параметровочная 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 мМЕд/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 мМЕд/мл)	0,05
Стандарт 2 (50 мМЕд/мл)	0,14
Стандарт 3 (200 мМЕд/мл)	0,43
Стандарт 4 (500 мМЕд/мл)	0,94
Стандарт 5 (1000 мМЕд/мл)	1,54

6.5 Качественные результаты

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

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

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

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ НОРМА

7.1 Уровень ХГЧ в норме в здоровых взрослых, небеременных:

Пол	Возраст	Количество	ХГЧ (мМЕд/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 мМЕд/мл	Неделя беременности	Концентрация мМЕд/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 мМЕд/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 контроли 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 случаи, пожалуйста, проверите 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 мМЕд/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 мМЕд/мл	9
чЛГ	200 мМЕд/мл	< 5
чЛГ	80 мМЕд/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 мМЕд/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 В пределах анализа

Вариативность в пределах анализа:

Образец	К-во	Среднее (мМЕд/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 (мМЕд/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. 1:1 (фл./фл.) мМЕд/мл	Измеряемая конц. (мМЕд/мл)	Ожидаемая конц. (мМЕд/мл)	Восстановление %
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 концентрация (мМЕд/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 мМЕд/мл ХГЧ.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 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.

11.2 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 только 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.

11.3 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, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com