

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ПЛЛ (ПЛАЦЕНТАРНИЙ ЛАКТОГЕН ЛЮДИНИ)

ELISA

hPL ELISA

Кат. №: EIA-1283

Дата випуску інструкції: 2016/12
Версія 10.0



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

1. ВВЕДЕННЯ

1.1 Найменування і призначення

Імуноферментний аналіз для кількісного *in vitro* визначення Плацентарного Лактогену (ПЛ) людини в сироватці.

1.2 Опис і пояснення тесту

Фізіологічна роль ПЛ поки ще не з'ясована, але велика схожість із гормоном росту породила гіпотезу про те, що ПЛ виступає в якості регулятора фетоплацентарного зростання і інших фізіологічних змін під час вагітності. Передбачається, що рівень цього гормону в сироватці матері може відображати так званий «індекс плацентарної функції». Знижені рівні ПЛ розглядаються як внутрішньоутробна загибель плода, хворобливі для плода пологи і асфіксія новонароджених. Це підтверджується особливо, коли зниження рівня повторюється в процесі спостереження, викликаючи хронічний стан плацентарного і, як наслідок, ембріонального компромісу. Зниження рівня не відбувається, якщо вагітність проходить без будь-яких подій, спокійно весь термін. Підвищені рівні зазвичай показують оптимальний результат при вагітності єдиною дитиною. Однак підвищення рівня може показувати важливі патології плода при специфічних захворюваннях, а саме: цукровий діабет, ембріональна макросомія, резус ізоімунізація, гідрамніон.

2 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір для імуноферментного аналізу Плацентарний Лактоген компанії DRG - це твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА), заснований на принципі «сендвіча».

Мікротитрові лунки покриті моноклональними (мишачими) антитілами, спрямованими проти унікального антигенного сайту на молекулі ПЛ. Аліквота проби пацієнта з ендogenous ПЛ інкубується в лунці з ферментним кон'югатом, який з себе являє анти-ПЛ антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому. Після інкубації нез'язаний кон'югат вимивається.

Кількість пероксидази, що зв'язалася, пропорційна концентрації ПЛ в зразку. При додаванні субстратного розчину з'являється фарбування, інтенсивність якого пропорційна концентрації ПЛ в пробі пацієнта.

3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in-vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
2. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
3. Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °C запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
5. Піпетування взірців та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.

7. Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полоскання.
9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °C) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
16. Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Уникати контакту зі *Стоп-розчином*, що містить 0.5 М H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. При попаданні в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
20. Хімічні речовини і приготвлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4 РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки:** 12 смужок по 8 лунок, покритих моноклональними анти-hPL антитілами.
2. **Стандарт (Стандарти 1-4):** 4 флакони, 0.5 мл, готові до використання;
Концентрації: 1.25-5.0-10.0-20 мг/л.
Коефіцієнт перерахунку 1 мг/л = 1 мМО/л. Стандарти відкалібровані за міжнародним стандартом NIBSC для ПЛ, IRP (73/545).
Містить безртутний консервант.
3. **Нульовий Стандарт** (він же Розчин для Розведення Зразків), 1 флакон, 90 мл, готовий до використання, 0 мг/л;
Містить безртутний консервант.
4. **Контроль Низький та Високий:** 2 флакони, 0.5 мл кожен, готові до використання;
Значення і діапазони дивіться на етикетці флакона або паспорті якості.
Містить безртутний консервант.
5. **Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 11 мл, готовий до використання,
Антитіло анти-hPL, кон'юговане з пероксидазою хрому;
Містить безртутний консервант.
6. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання.
Траметилбензидин (ТМБ)
7. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання,
Містить 0.5 М H₂SO₄,
Уникайте контакту зі *стоп-розчином*. Це може привести до пошкодження шкіри і опіків.

Примітка: Додатково *Нульовий Стандарт* для розведення зразків наявний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, що не постачаються в наборі

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450 нм±10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Пробірки для розведення зразків (12 x 75 мм).
- Напівлогарифмічний графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °C активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати. Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °C. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити.

Відкритий набір стабільний шість тижнів при зберіганні, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

4.5 Утилізація набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог місцевого регулювання. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкоджені набори

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати. Вони повинні зберігатись до вирішення проблеми. Після цього вони повинні бути знищені відповідно до вимог місцевого регулювання.

5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка може бути використана в аналізі.

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

Увага: зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте крові згорнутись і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для згортання крові.

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8 °C до 5 днів перед дослідженням.

Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20 °C. Після відтавання зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків

Перед початком аналізу зразки повинні бути **попередньо розведені 1:100 Нульовим Стандартом**.

- Внесіть в пробірку по 1 мл Нульового стандарту для кожного зразка.
- Додайте 10 мкл кожного зразка в відповідну пробірку. Перемішуйте протягом 10 сек. за допомогою Вортекс (уникайте спінування)

Контролі, вкладені в набір (Низький і Високий), поставляються в готовому для використання вигляді. Їх не потрібно розводити.

Зовнішні контролі (такі як контролі Bio-Rad) необхідно розводити також як і зразки.

Якщо під час початкового аналізу виявили, що концентрація зразка вище найвищого стандарту, зразок необхідно розвести *Нульовим Стандартом*, і досліджувати повторно згідно Процедури Аналізу.

Для розрахунку концентрації необхідно враховувати фактор розведення.

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура аналізу

ЗАУВАЖЕННЯ ПО ПРОЦЕДУРІ:

Ручне піпетування: Рекомендується використовувати не більше 32 лунок для проведення однієї серії аналізів. Піпетування всіх зразків, стандартів і контролів повинно бути завершено протягом 3 хвилин.

Автоматичне піпетування: Можливе використання всього планшета з 96 лунок. Проте, рекомендується завершити піпетування всіх стандартів,

зразків і контролів протягом 3 хвилин.

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

- Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативі.
- Додайте по **10 мкл** кожного **Стандарту/Контролю/Зразку** у відповідні лунки **кожен раз з новою насадкою**.
- Додайте по **100 мкл Ферментного Кон'югату** в кожну лунку. Ретельно перемішуйте впродовж 10 сек. На цьому етапі важливо провести повне змішування.
- Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі.
- Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **5 разів** дистильованою водою (**300 мкл на лунку**). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання!
- Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожну лунку.
- Інкубуйте **10 хвилин** при кімнатній температурі.
- Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **50 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку.
- Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10** нм за допомогою мікротитрового планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання *Стоп-Розчину*.

6.3 Розрахунок результатів

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-осі проти відповідних концентрацій на Х-осі.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
- Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
- Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, чим концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити або вважати як > 20 мг/л. При вирахованні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані наведені тільки для демонстрації і **не можуть** використовуватись для отримання результатів під час аналізу.

Стандарти	Оптичні одиниці
Нульовий 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)	1.17
Стандарт 4 (20.0 мг/л)	1.84

7 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

У дослідженні, проведеному на нормальних здорових дорослих людях, використовуючи набір DRG Плацентарний Лактоген, були отримані наступні дані:

Тиждень вагітності*	Значення
10-12	0.05-1.00 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

*Приклад:

Якщо пацієнтка в першій половині 12 тижня вагітності, будь ласка, дивіться діапазон для тижнів 10-12. Якщо пацієнтка в другій половині 12 тижня вагітності, будь ласка, дивіться діапазон для тижнів 12-14. Результати аналізу не можуть бути єдиною причиною терапевтичного заключення. Результат повинен корелювати з іншими клінічними дослідженнями і діагностичними тестами.

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролю відповідно до державних і місцевих правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю як нормального рівня так і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що постачається з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті, відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають у встановлені границі матеріалів контролю, результати є не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться в МЕЖАХ 0.04 - 20 мг/л.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані для виявлення крос-реакції:

Антиген	Концентрація	Еквівалент ПЛ
hCG	2000 МО/л	не визначається
AFP	300 МО/л	не визначається
hGH	100 мкг/л	не визначається
Пролактин	200 мкг/л	не визначається

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість визначена як середнє за мінусом 2 стандартних відхилень (20 реплік) аналізу Нульового Стандарту і склала 0.043 мг/л.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність в аналізі

Зразок	к-сть	Середнє, мг/л	КВ, %
1	18	0.66	6.06
2	18	2.34	5.55
3	18	6.24	6.73

9.4.2 Варіативність між аналізами

Сироватка	к-сть	Середнє, мг/л	КВ, %
1	39	0.68	8.82
2	24	2.52	7.14
3	24	6.87	5.67

9.5 Відновлення

Відновлення було визначено додаванням визначених кількостей аналіту в три різні сироватки, що містять різну кількість ендogenous аналіту. Відсоток відновлення було визначено шляхом порівняння очікуваних і певних концентрацій.

Зразок	Додані концентрації, мг/л	Очікувані концентрації, мг/л	Отримані концентрації, мг/л	Відновлення, %
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
2	10.0	8.58	10.00	85.8
	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

9.6 Лінійність

Зразок	Розведення	Отримані концентрації, мг/л	Очікувані концентрації, мг/л	Відновлення, %
1	без	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	без	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. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводиться з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Перехресно діючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/л), білірубін (до 0.5 мг/л) і тригліцериди (до 30 мг/л).

10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання hPL в зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні до 700 мг/л hPL.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні заключення

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

