

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель Департамента
государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской техники МЗ РФ
_____ Р.У. Хабриев

«8» ноября 2000 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ГонадотропинИФА-ХГч-1)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 8 от 18 сентября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,
УТВЕРЖДЕННОЙ 02 октября 1998 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ГонадотропинИФА-ХГч-1» предназначен для количественного определения хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Хорионический гонадотропин (ХГ) является гликопротеином с молекулярной массой около 37000 Да, состоящим из двух субъединиц — альфа и бета.

Количественное определение уровня ХГ считается наиболее надежным индикатором при ранней диагностике беременности.

Так, при помощи набора реагентов «ГонадотропинИФА-ХГч-1» можно диагностировать Беременность уже на 6-9-й день после оплодотворения.

Изменение концентрации ХГ в сыворотке крови беременных женщин является важным методом пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний (открытые пороки медуллярной трубы, синдром Дауна). Кроме того, этот метод широко применяется в акушерстве при диагностике множественной беременности, угрозе выкидыша и внематочной беременности.

Хотя присутствие ХГ в сыворотке крови обычно связано с нормальной беременностью, повышенные уровни ХГ также обнаруживаются у больных с тератогенными карциномами и трофобластическими новообразованиями и (иногда в случаях эктопического синтеза ХГ) при раке яичка, молочной железы, тонкого кишечника, легких и предстательной железы. Уровень ХГ при некоторых видах рака может достигать величин, превышающих 100000 МЕ/л. Измерение уровня ХГ является важным методом диагностики и мониторинга таких заболеваний.

1.3. Набор «ГонадотропинИФА-ХГч-1» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Примечание: В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «Гонадотропин ИФА-ХГч-1» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к β -ХГ. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ХГ-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ХГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ХГ-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ХГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ХГ в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата анти-ХГ-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ХГ в определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ХГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ХГ», 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Третьему международному стандарту ВОЗ75/537, содержащие известные количества ХГ; концентрации ХГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ХГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д₁» — 1 флакон (20 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ХГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител к β -ХГ с тиреотропным, лютеинизирующим и фолликулостимулирующим гормонами человека.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения ХГ в одном и том же образце с использованием набора «Гонадотропин ИФА-ХГч-1» не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ХГ в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д₁ имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет $\pm 10\%$.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ХГ — соответствие измеренной концентрации ХГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–100.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ХГ в сыворотке крови человека не превышает 2 МЕ/л.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «Гонадотропин ИФА-ХГч-1» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ХГ 400000 МЕ/л.

4.7. Клиническая проверка. Концентрация ХГ у 200 здоровых доноров обоих полов в возрасте 18–40 лет не превышала 10 МЕ/л. В таблице приведены значения ожидаемых показателей ХГ у женщин на различных сроках нормально протекающей беременности и соответствующие им рекомендуемые разведения сыворотки перед проведением анализа.

4.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ХГ, соответствующие нормальным.

Таблица

Срок беременности, неделя после зачатия	Медиана, МЕ/л	Толерантные пределы, МЕ/л	Рекомендуемое разведение сыворотки без разведения
2	150	50–300	без разведения
3–4	2 000	1 500–5 000	1: 20
4–5	20 000	10 000–30 000	1: 400
5–6	50 000	20 000–100 000	1: 400
6–7	100 000	50 000–200 000	1:400 и 1:2000
7–8	80 000	40 000–200 000	1:400 и 1:2000
8–9	70 000	35 000–140 000	1: 400
9–10	65 000	32 500–130 000	1: 400
10–11	60 000	30 000–120 000	1: 400
11–12	55 000	27 500–110 000	1: 400
13–14	50 000	25 000–100 000	1: 400
15–16	40 000	20 000–80 000	1: 400
17–21	30 000	15 000–60 000	1: 400

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной

гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- одноканальные пипетки с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- восьмиканальная пипетка, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- мерный цилиндр, позволяющий отмерять 200 мл;
- стеклянный стакан вместимостью 300 мл;
- дистиллированная вода;
- фильтровальная бумага;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Буфер Д₁ готов к использованию.

7.3. Предварительное разведение исследуемых сывороток. Если значения ХГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером Д₁ в 20, 400 и 2000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 20 раз): 190 мкл Буфера Д₁ + 10 мкл исследуемого образца.

Образец №2 (разведение в 400 раз): 190 мкл Буфера Д₁ + 10 мкл образца №1.

Образец №3 (разведение в 2000 раз): 160 мкл Буфера Д₁+ 40 мкл образца №2.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.4. Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.5. Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10раз. Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.6. Конъюгат анти-ХГ-пероксидаза готов к использованию.

7.7. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;

C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;

D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;

E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;

F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;

G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;

H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 150 мкл раствора конъюгата анти-ХГ-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

8.5. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с

последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Во все лунки немедленно внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 мин.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину B — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости B (ед.опт.плотн.) от концентрации ХГ в калибровочных пробах (МЕ/л). Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание ХГ в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ХГ умножить на фактор разведения.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор «ГонадотропинИФА-ХГч-1» должен храниться при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат анти-ХГ-пероксидаза, раствор ТМБ и буфер Д₁ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);

· БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.3. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

· количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;

· для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ХГ в контрольной сыворотке.

9.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ГонадотропинИФА-ХГч-1» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, телефон/факс: (812) 596-76-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, телефон: (095) 120-60-95.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-ХГ-пероксидаза, мкл	–	150	150	150	150	150	150	150	150
КП № 1, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300	5x 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 20 мин.								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 мин.								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;
КС — контрольная сыворотка;
С_х — анализируемые пробы;
ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»:
зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко
и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Польшцевым.