



EIA-4718, Free β -HCG

Набор ИФА для определения свободной β -субъединицы ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА в сыворотке человека

Кат. № : EIA-4718
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 02-2012
Версия 9.0

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

Этот набор является иммуноферментным анализом для количественного диагностического определения *in vitro* свободной β -субъединицы в хорионическом гонадотропине сыворотки человека (свободного β -ХГЧ).

1.2 Краткое описание и объяснение

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) это гликопротеиновый гормон обычно выделяемый плацентой во время беременности. Гормон присутствует в крови и моче приблизительно с 7 по 13 день после имплантации оплодотворенного яйцеклетки. Структурно исходные молекулы ХГЧ состоят из двух полипептидных участков соединенных нековалентной связью - альфа- и бета- цепочек. Измерения исходного ХГЧ и альфа-участка ХГЧ дают сходный результат в крови и моче, результат бета-участка отличается. В нормальной материнской сыворотке взятой во втором триместре, уровень исходного ХГЧ составляет от 20,000 мМЕ/мл до 50,000 мМЕ/мл (1 нг = 15 мМЕ). Напротив, уровни α - либо free β - ХГЧ в среднем составляют полпроцента уровня ХГЧ. ХГЧ и его свободные участки не представляют ценности для серологической диагностики не-трофобластических опухолей, но, сильное повышение уровня β -ХГЧ у пациентов с хориокарциномой четко дифференцирует их от нормальной беременности. Недавние исследования показали значительное повышение уровня свободного β -ХГЧ при трисомии 21 по сравнению с контрольными сыворотками. Исходя из этого было сделано предположение, что исследование субъединицы β -ХГЧ в комбинации с АФП материнской сыворотки может быть эффективно при скрининге трисомии 21.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор для анализа на свободный β -ХГЧ ELISA основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа. Тест-система использует уникальные моноклональные антитела к антигенной детерминанте на β -участке молекулы ХГЧ. Мышинные моноклональные антитела к β -ХГЧ используются для иммобилизации в твердой фазе (на микротитровальных лунках). Кроличьи антитела к β -ХГЧ находятся в ферментном конъюгате антител (с пероксидазой хрена). Тестовый образец реагирует последовательно с двумя антителами, в результате чего образуются «сэндвич»- комплексы из твердой фазы, молекул β -ХГЧ и антител конъюгата. После двух 30-минутных инкубаций при 37 °С, лунки промываются водой для удаления несвязанных меченых антител. Затем добавляется раствор ТМБ реагента и инкубируется 20 минут, что приводит к проявлению голубого окрашивания. Проявление цвета прекращается добавлением стоп-раствора, что изменяет цвет окрашивания на желтый. Концентрация β -ХГЧ прямо пропорциональна интенсивности окраски тестового образца. Абсорбция измеряется на спектрофотометре при 450 нм.

3. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2б поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (разделенных) полосок; 96 лунок.

Лунки покрыты анти-бета-ХГЧ антителом (моноклональным).

2. **Стандарт (Стандарт 0-5)**, 6 флаконов (лиофилизированных), 1,0 мл;
Концентрации: 0; 10; 25; 50; 100; 200 нг/мл
*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.
 3. **Контроль (низкий и высокий)**, 2 флакона (лиофилизированный), 1 мл.
Значение и диапазон контроля указаны на этикетке флакона или листе данных контроля качества. См. „Подготовка реагентов“
*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.
 4. **Нулевой буфер**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию.
*Содержит < 0,03% Проклина 300, 0,015% BND и 0,010% MIT в качестве консервантов.
 5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 18 мл, готовый к использованию. Анти-бета-ХГЧ антитело, конъюгированное пероксидазой хрена.
 6. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использ., ТМБ.
 7. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использ., содержит 0.5M H₂SO₄.
Избегайте контакта с раствором, поскольку это может привести к раздражению кожи и ожогам.
 8. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (концентрация 40х). См. „Подготовка реагентов“.
- Примечание:** Дополнительно нулевой буфер для разбавления образца предоставляется по запросу.

4.2 Требуемые, но не поставляемые оборудование и материалы:

- Микротитровальный планшетный откалиброванный ридер (450 +/- 10nm).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор который подходит для инкубации 37°C.
- Промокательная бумага.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Таймер (диапазоном 60 мин.).
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

4.3 Условия хранения

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

Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть.

4.4 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество стрипов к комнатной температуре.

Стандарты

Перерастворите лиофилизированное содержимое флаконов стандартов 1.0 мл дистиллированной воды и оставьте минимум на 10 мин. Перед использованием несколько раз перемешайте.

Замечание: перерастворенные стандарты стабильны до 30 дней при 2-8°C.

Контроли

Перерастворите лиофилизированное содержимое флаконов контролей 1.0 мл дистиллированной воды и оставьте минимум на 10 минут. Несколько раз перед использованием смешайте.

Замечание: перерастворенные контроли стабильны до 30 дней при 2-8°C.

Промывочный раствор

Разбавить 30 мл промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 2 недель при комнатной температуре.

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо проводить в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной 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. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка и моча.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Примечание: Образцы, содержащие азид натрия в анализе не должны использоваться.

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 центрифугировать до полного свертывания. Пациентам, подлежащим терапии антикоагулянтами, может потребоваться больше времени для свертывания.

5.2 Хранение образцов

Перед анализом образцы должны храниться закрытыми и могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Размороженные образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разбавление образцов

Если в первом анализе образцы с начальными значениями высшими, чем 2наивысший стандарт необходимо разбавить их рабочим буфером и

повторно проанализировать как описано в «Процедуре анализа». Для вычисления концентрации необходимо учесть последующий фактор разбавления:

Пример:

- а) Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл нулевого буфера (тщательно перемешайте);
 б) Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл нулевого буфера (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Общие замечания

- Перед использованием приведите все реагенты к комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала теста 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 инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
- В основном ферментная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Каждая процедура должна включать калибровочную кривую.

1. Закрепите нужное количество микротитровальных лунок в держателе..
2. Раскапать по **50 мкл** каждого стандарта, контроля и образца, используя новые наконечники, в соответствующие лунки.
3. Раскапать **100 мкл** нулевого буфера в каждую лунку.
4. Инкубировать при 37 °C **30 минут**.
5. Резко вытряхните содержимое лунок.
Промойте лунки **5 раз** разбавленным промывочным раствором (**400 мкл** на лунку). Резко постучите планшетом над промокающей бумагой, чтобы удалить остатки влаги.
Важное замечание: Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Добавьте в каждую лунку по **150 мкл** ферментного конъюгата.
7. Инкубировать при 37 °C **30 минут**.
8. Резко вытряхните содержимое лунок.
Промойте лунки **5 раз** разбавленным промывочным раствором (**400 мкл** на лунку). Резко постучите планшетом над промокающей бумагой, чтобы удалить остатки влаги.
9. Добавьте в каждую лунку по **100 мкл** раствора субстрата.
10. Инкубируйте **20 минут** при комнатной температуре.
11. Остановите ферментативную реакцию путем добавления **100 мкл** стоп реагента в каждую лунку. Важно убедиться в том, что синий цвет полностью превращается в желтый.
12. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм \pm 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора. **Рекомендуется проводить измерение** в течении **15 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Расчет результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную 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 стандартной кривой.
4. Автоматический метод: Результаты данной инструкции были определены автоматически с использованием 4 PL (4-параметровочной логистической) кривой. Другие функции обработки данных могут дать немного другой результат.
5. Концентрация образцов может считаться непосредственно со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить. При вычислении концентрации необходимо учитывать последующий коэффициент разбавления.

6.3.1 Пример типичной калибровочной кривой

Эти данные приведены только в качестве иллюстрации и не должны использоваться вместо полученных во время анализа данных.

Типичный пример стандартной кривой:

Стандарт	нг/мл	Оптич. единицы (450 нм)
Стандарт 0	0	0,02
Стандарт 1	10	0,22
Стандарт 2	25	0,46
Стандарт 3	50	0,81
Стандарт 4	100	1,28
Стандарт 5	200	1,97

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, что в каждой лаборатории установлены собственные нормальные и патологические значения. Единичные результаты не должны служить единственным основанием для любых терапевтических заключений. Результаты должны быть сопоставлены с другими клиническими обследованиями и диагностическими анализами.

7.1 Уровни субъединицы свободного β -ХГЧ при нормальной беременности

187 образцов от беременных женщин 1^{го} триместра были проверены с помощью набора DRG Free β -HCG ELISA. С помощью полулогарифмической бумаги было определено следующее уравнение регрессии:

$$\text{Медиана свободного } \beta\text{-ХГЧ} = \text{EXP}(6,579 - 0,0297 * \text{день беременности})$$

Неделя беременности	День беременности	Медиана от уравнения регрессии [нг/мл]	Медиана недели [нг/мл]
8	59	124,8	117,4
9	66	101,4	94,6
10	73	82,3	84,6
11	80	66,9	73,4
12	87	54,3	60,1
13	94	44,1	36,0

7.1.1 Использование для скрининга синдрома Дауна

Для расчета риска в пренатальном скрининге свободные концентрации β -ХГЧ указаны, как MOM (множество медиан, MOM = измеренная концентрация (свободный β -ХГЧ) / медиана свободного β -ХГЧ). При беременностях с синдромом Дауна медиана MOM свободного β -ХГЧ увеличивается в течение первого и второго триместра (ссылка 16, подробнее см. таблицу).

Полные недели беременности	10	11	12	13	14-20
Медиана MOM при беременностях с синдромом Дауна	1,62	1,94	2,19	2,48	2,66

7.2 Уровни ХГЧ и свободных субъединиц при хориокарциноме беременности

Уровни свободного α - и свободного β -ХГЧ измерялись у 5 пациентов с нелеченной гестационной хориокарциномой. Концентрации в сыворотке указаны в следующей таблице.

К-во пациентов	ХГЧ (нг/мл)	Свободный α -ХГЧ (нг/мл)	Свободный β -ХГЧ (нг/мл)
1	210,000	112	8,000
2	22,195	20	1,300
3	6,840	1	232
4	36,000	44	3,900
5	4,200	2	350

Уровни свободного β -ХГЧ были низкими, от 1 до 112 нг/мл, тогда как уровни ХГЧ были в диапазоне 4,200 - 210,000 нг/мл (1 нг ~15 мМЕ). Напротив, концентрации свободного β -ХГЧ были значительно повышены при хориокарциноме.

7.3 Эктопическая секреция ХГЧ и свободных участков нетрофобластическими опухолями

В таблице ниже приведены результаты исследований пациентов с различными опухолями, с доброкачественными опухолями и здоровых пациентов.

Тип опухоли	Кол-во образцов	ХГЧ (нг/мл)	α -ХГЧ (нг/мл)	β -ХГЧ (нг/мл)
Шейка матки	20	0	1 (1.6) ^a	1 (0.65)
Тело матки	20	0	0	0
Желудок	20	0	0	1 (1.5)
Поджелудочная железа	20	0	1 (1.6.0)	2(0.8,3.1)
Толстая кишка	20	0	0	0
Легкое	20	0	1 (90.0)	1 (0.7)
Яичник	20	0	1 (1.8)	0
Простата	20	0	1 (1.6)	0
Другие опухоли	18	0	0	0
пищеварительного тракта				
Всего [%]	178	0	5[3]	5[3]
Доброкачественные поражения, контроль	61	0	1 (1.6)	0
Здоровый контроль	50	0	0	0
Всего	111	0	1 [1]	0

^aЧисло в круглых скобках представляет собой измеренное значение в нг/мл.

Значения cut-off для положительных результатов равны 1,5 нг/мл для ХГЧ и α -ХГЧ и 0,4 нг/мл для β -ХГЧ.

При сравнении со значениями здоровых пациентов, все пациенты с нетрофобластическим раком имели уровень ХГЧ внутри диапазона нормальных значений (~ 0.9 нг/мл). Концентрации свободных субъединиц были повышены у 10 из 178 пациентов. Стоит заметить, что уровни α -ХГЧ у двух пациентов (опухоль поджелудочной железы и легких) были относительно высокими (16 и 90 нг/мл, соответственно), в то время как максимальная концентрация свободного β -ХГЧ составила 3.1 нг/мл (опухоль поджелудочной железы).

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

Диапазон анализа находится в пределах 0,2-200 нг/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Исследуемый гормон	Концентрация	Выработанная интенсивность цвета Соответствует свободному β -ХГЧ в сыворотке
ТСГ	25 мМЕ/мл	< 0,3 нг/мл
ФСГ	100 мМЕ/мл	< 0,2 нг/мл
Пролактин	100 мМЕ/мл	< 0,5 нг/мл
ЛГ	200 мМЕ/мл	< 1 нг/мл

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность составила 0,2 нг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 В анализе

Образец	К-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	10	4,49	6,78
2	10	27,75	6,60
3	10	107,6	5,83

9.4.2 Между анализами

Образец	К-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	9	14,94	8,00
2	9	26,34	8,03
3	9	100,94	6,73

9.5 Восстановление

Восстановление набора было определено путем добавления увеличивающихся порций аналита к двум различным образцам сыворотки, содержащим различные количества эндогенного аналита. Каждый образец (ненасыщенный и насыщенный) испытывался и были рассчитаны и концентрации аналитов образцов из калибровочной кривой. Процент восстановлений был определен путем сравнения ожидаемых и измеренных значений образцов.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [нг/мл]	25,73	97,12	99,88
Среднее восстановление [%]	101,8	90,5	99,88
Диапазон восстановления [%]	от	98,4	86,2
	до	109,4	94,9

9.6 Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [нг/мл]	28,30	79,27	185,14
Среднее восстановление [%]	102,5	105,7	104,9
Диапазон восстановления [%]	от	99,3	103,4
	до	109,3	109,1

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Любое неправильное обращение с образцами или изменение этой процедуры может повлиять на результаты.

10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,125 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарственных средств

На сегодняшний день неизвестно какие вещества влияют на измерение свободного β -ХГЧ в образце.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

В данном анализе не «хук-эффекта» не наблюдалось до 19800 нг/мл свободного β -ХГЧ.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua