

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА (ХГЧ) ЧЕЛОВЕКА

### 825-300, $\beta$ -Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Test System

Каталог. № : 825-300

Методика от 06-11-2012

Количество : 96

Версия 3

Производитель: **Monobind (США)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

#### 1.0 НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение концентрации хорионического гонадотропина в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа.

#### 2.0 ВВЕДЕНИЕ

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) представляет собой гликопротеин, концентрация которого сильно растет в крови и моче во время нормально протекающей беременности. ХГЧ секретируется тканью плаценты, начиная с первичного трофобласта, почти с момента имплантации, и поддерживает функцию желтого тела в первые недели беременности. ХГЧ – гликопротеин, который может продуцироваться большим числом опухолей трофобластического и нетрофобластического происхождения. Исследование ХГЧ с соответствующими чувствительностью и специфичностью имеет большое диагностическое значение для диагностики беременности и ранних нарушений нормального течения беременности.

По литературным данным, ХГЧ, определяемый на 10-й день после овуляции, достигает 100 мМЕд/мл в первом наблюдаемом периоде. После времени, необходимого для наступления следующей овуляции, уровень ХГЧ достигает 200 мМЕд/мл (приблизительно через 28 дней после зачатия) (1). Пик в 50 000 или даже 100 000 мМЕд/мл достигается на 3-м месяце, после чего постепенно снижается (2, 3).

В этом методе калибраторы ХГЧ, пробы пациента или контроли сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляются биотинилированные моноклональные антитела и фермент-меченые антитела (направленные против специфичных и разных эпитопов ХГЧ), и реагенты перемешиваются. Реакция между различными антителами к ХГЧ и нативными формами ХГЧ образует комплекс типа «сэндвич», который связывается со стрептавидином в ячейках.

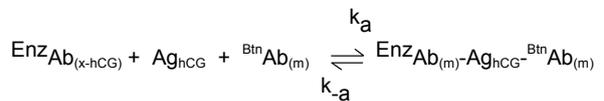
После завершения необходимого инкубационного периода антитела, связанные с конъюгатом, отделяются от несвязавшегося конъюгата промывкой. Активность фермента на поверхности ячеек измеряется реакцией с соответствующим субстратом.

Использование стандартов ХГЧ с известными различными концентрациями позволяет построить калибровочную кривую. Концентрации ХГЧ в неизвестных образцах находят по этой калибровочной кривой.

#### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящие реагенты, требующиеся для иммуноферментного определения, включают высокоочищенные и специфичные антитела в избыточном количестве (ферментные и иммобилизованные) для индивидуального распознавания эпитопов, в избыточном количестве, и естественный антиген. В процессе анализа иммобилизация происходит на поверхности микроячеек при взаимодействии ячеек, покрытых стрептавидином, и экзогенных биотинилированных анти-ХГЧ антител.

При смешивании моноклональных биотинилированных антител, ферментного конъюгата и сыворотки, содержащей естественный антиген, между нативным антигеном и антителами происходит реакция (без конкуренции или пространственных затруднений) с образованием растворимого сэндвич-комплекса. Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



где  $\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$  - биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество)

$\text{Ag}_{\text{hCG}}$  - нативный антиген (переменное количество)

$\text{EnzAb}_{(\text{x-hCG})}$  - фермент-меченые поликлональные антитела (избыточное количество)

$\text{EnzAb}_{(\text{hCG})}\text{-Ag}_{\text{hCG}}\text{-B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$  - сэндвичевый комплекс антиген-антитело

$k_a$  - константа скорости ассоциации

$k_{-a}$  - константа скорости диссоциации

Одновременно комплекс образуется в ячейках при реакции стрептавидина и биотинилированных антител. Это взаимодействие иллюстрируется так:



где стрептавидин<sub>с.в.</sub> - стрептавидин, иммобилизованный на ячейках иммобилизованный комплекс - сэндвичевый комплекс, связанный с твердой поверхностью

После достижения равновесия фракция, связанная с антителами, отделяется от несвязавшихся антигенов декантацией или промывкой. Активность фермента во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

#### 4.0 РЕАГЕНТЫ

##### Поставляемые материалы:

##### A. Калибраторы ХГЧ - 1 мл во флаконе - значки A-F

Шесть флаконов стандартов антигена ХГЧ с концентрациями 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) и 250 (F) мМЕд/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.

**Замечание:** Калибраторы приготовлены на человеческой сыворотке и прокалиброваны по Третьему Международному Стандарту ВОЗ (75/537)

B. Ферментный реагент: - 13 мл во флаконе - значок Один флакон, содержащий фермент-меченые очищенные антитела, биотинилированные моноклональные мышиные IgG в буфере, краситель и консервант. Хранить при 2-8°C.

C. Планшет, покрытый стрептавидином - 96 ячеек - значок Один 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином и запаянный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.

D. Концентрат промывочного буфера - 20 мл - значок Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-8°C.

E. Субстрат A - 7 мл - значок S<sup>A</sup> Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.

F. Субстрат B - 7 мл - значок S<sup>B</sup> Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.

G. Стоп-раствор - 8 мл - значок Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.

##### H. Инструкция

**Замечание 1:** Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

**Замечание 2:** Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

**Замечание 3:** Реагенты предназначены для использования с 96-луночным планшетом.

##### 4.1 Необходимые материалы, не поставляемые с набором

1. Микродозатор на 25 и 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Микропланшетный вошер
4. Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм и 620 нм
5. Фильтровальная бумага для высушивания микроячеек
6. Пластиковая пленка для инкубации
7. Вакуумный осушитель для стадии промывки
8. Таймер
9. Контрольные материалы

## 5.0 ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор предназначен только для диагностики *in vitro*  
Не для использования в качестве лекарственного средства  
людьми или животными

Используемая в наборе сыворотка человеческой крови отрицательна на антитела против ВИЧ 1+2 и гепатита С, и поверхностный антиген гепатита В и протестирована методами, одобренными FDA. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых потенциально опасных человеческих сывороток или образцов крови. Руководствуйтесь в работе соответствующими национальными документами.

## 6.0 СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцами для анализа должна быть сыворотка крови. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для того, чтобы лучше сравнивать результаты, следует отбирать кровь утром натощак. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянта. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу. Образцы могут храниться при 2-8 °С до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °С на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0,050 мл сыворотки.

## 7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней для мониторинга правильности теста. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Каждая лаборатория должна установить приемлемые характеристики набора. К числу других параметров, за которыми следует следить, относится воспроизводимость изо дня в день между анализами. Строятся контрольные карты и используются соответствующие статистические методы для установления тенденции смещения контрольных значений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для установления причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

## 8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

### 1. Промывочный раствор

Вылейте содержимое концентрата промывочного буфера в 1000 мл сосуд. Разбавьте до 1000 мл дистиллированной водой. Хранить при комнатной температуре (20-30°C) до 60 дней.

### 2. Рабочий субстратный раствор

Вылейте содержимое коричневого флакона с пометкой «Раствор А» в прозрачный флакон с пометкой «Раствор В». Закройте желтой крышкой прозрачный флакон для легкой идентификации. Перемешайте и пометьте флакон. Хранить при 2-8°C.

**Замечание:** не используйте Рабочий субстратный раствор, если он приобрел голубую окраску.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы обратно в пакет, закройте и храните при 2-8°C.**
2. Добавьте пипеткой по 25 мкл стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте пипеткой по 100 мкл Ферментного реагента в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд и накройте его пластиковой пленкой.
5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
7. Добавьте 350 мкл промывочного буфера (см. раздел «Приготовление реагентов») и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). **Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с**

инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).

8. Добавьте пипеткой по 100 мкл рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. «Приготовление реагентов»). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

### НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТНОГО РАСТВОРА

9. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре.
10. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
11. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек при 450 нм (референсная длина волны 620-630 нм). **Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.**

## 10.0 РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения концентрации ХГЧ в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

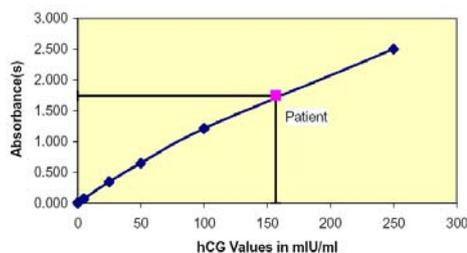
1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой используйте средние из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации ХГЧ в мМЕд/мл.
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите неизвестные концентрации ХГЧ в контролях и образцах по калибровочной кривой, используя средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 1,745 пересекает стандартную кривую при 157 мМЕд/мл (см. рис.1).

**Замечание:** для расчета также можно использовать специальные компьютерные программы для ИФА.

### Пример 1

Образец	№ ячейки	Опт. Плотность (ОП)	Среднее ОП	Значение (мМЕд/мл)
Кал. А	A1	0,002	0,004	0
	B1	0,005		
Кал. В	C1	0,073	0,071	5
	D1	0,069		
Кал. С	E1	0,340	0,350	25
	F1	0,360		
Кал. D	G1	0,637	0,650	50
	H1	0,663		
Кал. E	A2	1,223	1,212	100
	B2	1,199		
Кал. F	C2	2,518	2,502	250
	D2	2,486		
Контроль 1	E2	0,075	0,076	5,8
	F2	0,077		
Контроль 2	G2	0,280	0,290	21,9
	H2	0,301		
Обр. пациента	A3	1,736	1,745	157
	B3	1,754		

Рисунок 1



Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и **не должны использоваться для построения стандартной кривой.**

## 11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Стандарта 0 нг/дл должна быть  $\geq 1.3$
2. Четыре из шести контролей качества должны быть в пределах установленных диапазонов.

## 12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

### 12.1 Проведение анализа

- Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
- Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
- Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
- Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
- Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
- Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
- Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
- Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
- Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
- Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
- Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных Monobind Inc., может быть запрошен у [Monobind@Monobind.com](mailto:Monobind@Monobind.com).

### 12.2 Интерпретация

- Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
- Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализам.
- Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
- Производитель не несет ответственности** за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
- Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.
- Ложно положительные результаты могут быть получены в присутствии широкого разнообразия трофобластических и нетрофобластических опухолей, секретирующих ХГЧ. Исходя из этого, необходимо исключить неоплазмы, секретируемые ХГЧ, перед подтверждением беременности.
- Также ложно положительные результаты могут наблюдаться при анализе образцов от пациентов, принимающих лекарственные препараты Пергонал и Кломид.
- При спонтанных микроабортах и эктопических беременностях будут наблюдаться значения, ниже от ожидаемых, при нормальной беременности, в тоже время завышенные значения часто наблюдаются при многоплодных беременностях.
- После терапевтического аборта обнаруживаемые ХГЧ могут наблюдаться на протяжении трех-четырех недель.
- Само по себе значение ХГЧ не является диагностической величиной** и должно использоваться вместе с другими клиническими данными.

## 13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ ЗНАЧЕНИЙ

Было проведено исследование взрослой популяции для получения результатов в мМЕд/мл (3-й IS 75/537) на этом наборе. Результаты исследования показаны в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Ожидаемые значения для ХГЧ в мМЕд/мл (3-й IS 75/537)

Количество образцов	25
Среднее	2.9
Стандартное отклонение	1.4
Ожидаемый диапазон ( $\pm 2 \sigma$ )	0.1-5.7

ТАБЛИЦА 2

Ожидаемые значения для уровней ХГЧ нормальной беременности в мМЕд/мл (3-й IS 75/537)

1-ая неделя гестации	10-30
2-ая неделя гестации	30-100
3-ая неделя гестации	100-1000
4-ая неделя гестации	1000-10000
2-3 месяц гестации	30,000-100,000
2-й триместр	10,000 – 30,000
3-й триместр	5,000-15,000

Важно иметь в виду, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода, зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 14.1 Воспроизводимость.

Воспроизводимость набора на ХГЧ внутри серии и между сериями определялась при анализе контрольных сывороток трех разных уровней. Число, значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток этих сывороток приведены в таблицах 3 и 4.

ТАБЛИЦА 3

Воспроизводимость внутри серии (Значения в мМЕд/мл)

Образец	N	X	$\sigma$	CV
Уровень 1	20	4.4	0.22	4.9%
Уровень 2	20	18.7	0.75	4.0%
Уровень 3	20	214.8	14.59	6.8%

ТАБЛИЦА 4

Воспроизводимость между сериями\* (Значения в мМЕд/мл)

Образец	N	X	$\sigma$	CV
Уровень 1	20	5.4	0.52	9.6%
Уровень 2	20	22.4	1.97	8.8%
Уровень 3	20	213.1	15.16	7.1%

\* измерения проводились в 10 экспериментах в дублях.

### 14.2 Чувствительность

Чувствительность метода - 0.003 мМЕд/лунку. Это эквивалентно образцу, содержащему ХГЧ с концентрацией 0.102 мМЕд/мл.

### 14.3 Точность

Этот метод hCG ELISA/IEMA MICROPLATE был сравнен с радиоиммунным методом. Сравнивались образцы от небеременных и беременных женщин. Общее количество образцов составило 110. Квадратичное уравнение регрессии и коэффициент корреляции были вычислено для hCG ELISA в сравнении с методом сравнения. Полученные данные показаны в Таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	14.8	$Y=0.081+0.93(x)$	0.989
Метод сравнения	15.1		

Только незначительное расхождение данного метода и референс-метода было найдено, что доказывают близкие средние значения. Уравнение регрессии и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

### 14.4 Специфичность

Перекрестные реакции метода к различным веществам оценивались добавлением мешающих веществ в различных концентрациях к сывороточной матрице. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой мешающего вещества и дозой ХГЧ, необходимого для получения такой же оптической плотности.

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
ХГЧ	1.0000	-----
$\beta$ -субъединица ХГЧ	< 0.0001	1000 нг/мл
ФСГ	< 0.0001	1000 нг/мл
ЛГ	< 0.0001	1000 нг/мл
ТТГ	< 0.0001	1000 нг/мл



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