

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНА (HPL)

## BS-85-24, HPL ELISA

Каталог. № : **BS-85-24**  
Количество : **96**  
Производитель: **Bioserv**  
**Diagnostics, (Германия)**

Методика от 17-08-2012



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

12 стрипов x 8 ячеек (ломаются на отдельные ячейки) Хранить при 2-8°C

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Иммуноферментный набор предназначен для определения плацентарного лактогена (HPL) в человеческой сыворотке.

Для диагностики *in vitro*

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Человеческий плацентарный лактоген (HPL), синоним HCS (человеческий хорионический соматотропин). HPL - один из двух белковых гормонов, синтезируемых плацентой и секретируемый в материнское кровеносное русло, чья роль заключается в поддержании беременности. Второй из этих двух гормонов - ХГЧ (человеческий хорионический гонадотропин). Функция HPL состоит в мобилизации материнских глюкозы, жирных кислот и кетоновых тел для энергетических потребностей растущего плода, к тому же HPL имеет маммо- и лактотропный эффекты.

HPL является негликозилированным полипептидом с молекулярной массой 21,5 Kda, состоит из 191 аминокислоты и синтезируется синцитио- трофобластом. Концентрация в материнской крови достигает максимума к 36 неделе гестации и затем незначительно снижается перед родами. В последний период гестации концентрация HPL в материнской сыворотке прямо коррелирует с массой плаценты. Биологическая активность HPL проявляется лактогенным и соматотропным эффектами, в метаболизме углеводов и липидов, иммуносупрессивным эффектами. Основная физиологическая функция ещё неизвестна. Время полужизни в материнской крови очень короткое: 20-30 минут, поэтому изменения в отношении продукция/секреция могут быть зарегистрированы очень быстро.

Снижение концентрации HPL патогномично для нарушения функции плаценты, которое может быть в результате внутриутробной задержки развития, внутриутробной гибели плода или угрожающей потери плода. Особенно беременные женщины страдают от гипертонии, в этом состоянии сывороточная концентрация HPL снижена. Благодаря короткому времени полужизни определение HPL в сыворотке всегда отражает реальную ситуацию. Повышение концентрации HPL найдено у женщин, больных сахарным диабетом и, по причине большой массы плаценты, при многоплодной беременности. В отличие от эстриола концентрация HPL зависит только от массы плаценты и её функциональных возможностей, но не от фетальных функций. Одновременное определение HPL и эстриола

### ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

HPL BIOSERV™ - ELISA - может использоваться в клинической практике для:

- Контроля случаев предполагаемых нарушений раннего периода беременности
- Контроля плацентарной функции позднего периода беременности у беременных из группы риска

### ПРИНЦИП МЕТОДА

HPL BIOSERV™-ELISA – твёрдофазный иммуноферментный сэндвич-анализ для количественного определения HPL в человеческой сыворотке.

Планшет покрыт моноклональными антителами, специфично распознающими эпитоп HPL. HPL, содержащийся в образцах и

стандартах, связывается с антителами во время инкубации с иммобилизацией на планшете. После промывки добавляется ферментный конъюгат (ковалентно связанные с пероксидазой хрена другие моноклональные антитела к HPL), который будет связываться с HPL. Несвязавшиеся антитела удаляются во время второй промывки. На стадии последней инкубации образовавшийся пероксидазный комплекс ферментативно окисляется субстратным раствором ТМБ. Ферментная реакция останавливается через определенное время добавлением раствора серной кислоты (0,25 моль/л). Концентрация окисленного ТМБ измеряется фотометрически на длине волны 450 нм. Рекомендуется использование референс-длины волны (>550 нм).

### РЕАГЕНТЫ (на 96 определений)

|   |          |
|---|----------|
| 1. Стандарты (готовы для использования) во флаконах:<br>Стандарт 1 (1,25 - мг/л, прозрачная крышка);<br>Стандарт 2 (5,0 мг/л - белая крышка);<br>Стандарт 3 (10,0 мг/л - жёлтая крышка);<br>Стандарт 4 (20 мг/л - голубая крышка) | 0,5 мл   |
| 2. Стандарт О/ Разбавитель образцов (0 мг/л)  | 90 мл    |
| 3. Контроль О (1,2-2,0 мг/л – розовая крышка)   | 0,5 мл   |
| 4. Контроль 2 (4-8 мг/л – пурпурная крышка)   | 0,5 мл   |
| 5. Ферментный конъюгат (моноклональные анти-HPL антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена)   | 11 мл    |
| 6. Субстратный раствор (ТМБ, готов для использования)   | 13,0 мл  |
| 7. Стоп-раствор, 0,25 моль/л серной кислоты (готов для использования)   | 13,0 мл  |
| 8. Стрипы, покрытые моноклональными анти-HPL антителами   | 96 ячеек |
| 9. Рамка для стрипов  | 1        |

### Требуемые, но не поставляемые материалы

Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм и референс-фильтром >550 нм  
Дозаторы с наконечниками (5, 50, 100 и 1000 мкл)  
Пробирки для разбавления образцов  
Дистиллированная или деионизированная вода  
Фильтровальная бумага  
Пожалуйста, используйте только калиброванные пипетки и оборудование

### Общие замечания

1. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.
2. Не допускайте контакта с стоп-раствором -возможно раздражение кожи и ожого.
3. Не отбирайте реагенты ртом.
4. Все компоненты крови и биологические материалы могут быть потенциально опасны. Обращайтесь с ними с величайшей осторожностью.
5. Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом согласно национальным руководствам по биологической безопасности.

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

1. Компоненты набора разработаны для использования как единое целое. Не используйте компоненты из других наборов.
2. Все реагенты и образцы должны достигнуть комнатной температуры перед использованием.
3. Все реагенты необходимо перемешивать, не допуская образования пены.
4. Не прерывайте последовательность операций при выполнении начатого анализа, работайте без задержек.
5. Дозируйте все реагенты и образцы прямо на дно ячеек. Перемешивания после внесения реагентов не требуется.
6. Используйте новый одноразовый наконечник для каждого образца.
7. Значение оптической плотности в иммуноферментном анализе зависит от времени и температуры инкубации. Поэтому так важно правильно подготовить реагенты перед выполнением анализа (предварительное разведение образцов, установка стрипов в рамку и т.д.). Только тщательная подготовка обеспечивает равные промежутки времени для всех шагов инкубации без задержек.
8. Для оптимальных результатов необходима тщательная промывка стрипов после инкубации. Убедитесь в том, что каждая ячейка заполняется полностью, что аспирация жидкости

между циклами и в конце полная, и что ячейки сухие. Если осталась часть жидкости, переверните планшет на фильтровальную бумагу и легко постучите по нему.

9. Так как кинетика ферментативной реакции зависит от окружающей температуры, то оптическая плотность будет коррелировать с комнатной температурой. Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-22°C.
10. Проводите каждое измерение стандартов и проб пациентов в дублях для уменьшения ошибок процедуры анализа.

#### РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

1. Хранить реагенты при 2 - 8 °С.
2. Реагенты стабильны до истечения срока годности набора.
3. Закрывайте флаконы с реагентами сразу после использования, не меняйте крышки на флаконах.
4. Храните стрипы микропланшета в пакете с осушителем. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно верните в пакет с осушителем и плотно закройте пакет. При соблюдении данных условий стрипы стабильны не менее 4 недель после первого вскрытия пакета.

#### ОБРАЗЦЫ

Сыворотка.

#### СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите кровь обычной венопункцией, позвольте ей свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Избегайте гемолиза. Избегайте повторных циклов заморозки и разморозки образцов - готовьте аликвоты, если необходимо. Храните образец 1. плотно закрытыми, чтобы предотвратить контаминацию или разрушение анализа.

2. Липемические или гемолизированные образцы могут дать некорректные результаты.

3. 1. Обращайтесь с образцами с большой аккуратностью, так как они могут быть инфицированы.
2. Не выявлена интерференция с другими внешними факторами или веществами.
3. Образцы могут храниться в различных температурных условиях в течение следующих промежутков времени:

при комнатной температуре (до 30°C) в течение 3 дней при 2-8°C в течение 1 недели -

-10°C - -20°C или ниже - до 1 года.

**ВНИМАНИЕ: ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ**

Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами и образцами человеческой крови надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.

#### Подготовка образцов сыворотки к анализу

Промаркируйте пробирки. Разбавьте образцы пациентов в 1:100 раз перед выполнением анализа: внесите 1 мл Разбавителя образцов в каждую пробирку, затем добавьте по 10 мкл образцов сыворотки пациентов. Тщательно перемешайте. Получается разведение 1:101, если быть точным, но это небольшое отклонение не учитывается.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре и аккуратно перемешаны перед использованием.
2. Установить требуемое число сорбированных антителами стрипов в рамку.
3. Добавить по 50 мкл каждого стандарта и **разведённые** (1:100) образцы сыворотки в соответствующие ячейки, используя одноразовые наконечники.
4. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
5. Энергично встряхнуть реакционный раствор из лунок. Промыть 3 раза по 200 мкл дистиллированной или деионизированной водой.
6. После последнего цикла промывки переверните планшет на фильтровальную бумагу и встряхните остатки воды.
7. Добавить 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
8. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
9. Удалить реакционный раствор из лунок. Промыть 5 раз по 200 мкл дистиллированной или деионизированной водой.
10. После последнего цикла промывки переверните планшет на фильтровальную бумагу и встряхните остатки воды.
11. Добавить 100 мкл субстратного раствора (готового для использования) в каждую ячейку.
12. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре

**(Внимание: заметьте время после добавления субстратного раствора в первую лунку).**

13. Остановить ферментную реакцию добавлением 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку в той же последовательности и с той же скоростью, что и субстратный раствор.
14. Измерить оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм. Желательно использовать длину волны сравнения >550 нм, мы рекомендуем проводить измерение не позднее 10 минут после остановки реакции.

В большинстве случаев ферментная реакция зависит от времени и температуры инкубации. Следовательно, интерпретация результатов возможна только при определённых физико-химических условиях.

Если абсорбция Стандарта 4 (20 мг/л) оказывается ниже 1,0 Ед оптической плотности, время инкубации последней инкубации может быть увеличено.

Если, наоборот, абсорбция Стандарта 4 (20 мг/л) оказывается выше предела измерения микропланшетного фотометра, время инкубации последней инкубации может быть сокращено.

Так как стандарты анализируются в каждой постановке, колебания абсорбции не влияют на абсолютные результаты концентрации аналита.

#### Схема расположения образцов на планшете

(См. оригинал инструкции.)

В этой схеме указана рекомендуемая позиция для Стандарта 0 (S0), стандартов 1-4 (S1 - S4) , контролей C1 и C2 и для образцов пациентов (P1-P41) в дублях.

#### ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат каждого пациента рассчитывается по стандартной кривой: Рассчитайте среднее поглощение для исследованных стандартов, контролей и образцов пациента.

По оси (Y) откладывается оптическая плотность каждого стандарта, а по оси (X) соответствующая концентрация в мг/л.

Используйте оптическую плотность каждого образца для расчета концентрации по стандартной кривой.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

При температуре выше 30°C образцы необходимо транспортировать в рефрижераторе. Время остановки ферментной реакции необходимо настроить (сократить).

Нельзя использовать сильно гемолизированные или липемические образцы от пациентов с заболеваниями печени. На результаты могут неблагоприятно повлиять определённые патологические состояния, например, поли- и моноклональная гаммапатия, аутоиммунные заболевания или нарушения иммунного статуса.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений для своей популяции пациенток. Приведенные ниже значения получены на данном наборе в произвольно взятых образцах у женщин с известным сроком гестации. Все данные концентрации HPL приведены в мг/л = мкг/мл.

| Неделя беременности | Абсолютный диапазон |
|---------------------|---------------------|
| До 20               | 0,05 - 1            |
| До 22               | 1,5-3               |
| До 26               | 2,5-5               |
| До 30               | 4-6,5               |
| До 34               | 5-8                 |
| До 38               | 5,5-9,5             |
| До 42               | 5-7                 |

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

##### 1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определялась путем нескольких определений каждого из трёх образцов человеческой сыворотки:

| Образец                  | I    | II   | III   |
|--------------------------|------|------|-------|
| N                        | 18   | 18   | 18    |
| Значение HPL, мг/л       | 2,61 | 8,39 | 12,45 |
| Стандартное отклонение   | 0,16 | 0,55 | 0,50  |
| Коэффициент вариации (%) | 6,02 | 6,60 | 4,06  |

## 2. Воспроизводимость между сериями

исследований определялась путем анализа в дублях трёх образцов человеческой сыворотки в различных постановках:

| Образец                  | I    | II   | III   |
|--------------------------|------|------|-------|
| N                        | 28   | 28   | 28    |
| Значение HPL, мг/л       | 2,39 | 7,65 | 12,85 |
| Стандартное отклонение   | 0,18 | 0,49 | 0,64  |
| Коэффициент вариации (%) | 7,45 | 6,37 | 4,97  |

## 3. Линейность

Образцы человеческой сыворотки, содержащие различные уровни HPL были проанализированы с добавлением различных количеств HPL. Анализ линеен до концентрации 10 мг/л.

## 4. Извлечение

Образцы человеческой сыворотки были разбавлены нулевым стандартом и исследованы.

| Образец | Разбавление | Ожидаемая концентрация (мг/л) | Наблюдаемая конц. (мг/л) | % от ожидаемого |
|---------|-------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------|
| I       | 1:50        | 18,14                         | 18,14                    | 100,0           |
|         | 1:100       | 9,07                          | 9,31                     | 102,6           |
|         | 1:200       | 4,54                          | 3,95                     | 87,0            |
|         | 1:400       | 2,27                          | 1,92                     | 84,6            |
|         | 1:800       | 1,14                          | 0,95                     | 83,3            |
| II      | 1:50        | 15,31                         | 15,31                    | 100,0           |
|         | 1:100       | 7,66                          | 8,07                     | 105,4           |
|         | 1:200       | 3,83                          | 3,50                     | 91,3            |
|         | 1:400       | 1,92                          | 2,12                     | 108,6           |
|         | 1:800       | 0,96                          | 0,80                     | 83,3            |

## 5. Чувствительность

Теоретическое значение чувствительности или минимально определяемое значение рассчитано интерполяцией среднего значения плюс два стандартных отклонения нулевого стандарта (95% доверительный интервал) и равно 0,05 мг/л для сыворотки.

## 6. Перекрестная реактивность



**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)

| Соединение   | Влияние на интенсивность цветной реакции равного количества HPL в сыворотке |
|--|---|
| <b>Человеческий сывороточный альбумин:</b><br>20 мг/мл<br>50 мг/мл     | 0<br>0  |
| <b>Человеческий гонадотропин (ХГЧ):</b><br>1200 нг/мл<br>2400 нг/мл    | 0<br>0  |
| <b>Пролактин:</b><br>200 нг/мл<br>400 нг/мл                            | 0<br>0  |
| <b>Альфа-фетопротеин:</b><br>100 нг/мл<br>200 нг/мл                    | 0<br>0  |
| <b>Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ):</b><br>50 ММЕ/мл<br>100 ММЕ/мл | 0<br>0  |
| <b>Лютеинизирующий гормон (ЛГ):</b><br>100 ММЕ/мл<br>200 ММЕ/мл        | 0<br>0  |