

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОЙ β СУБЪЕДИНИЦЫ ХГ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «св β ХГ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «св β ХГ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации свободной β субъединицы ХГ в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Хорионический гормон (ХГ) – гликопротеин, вырабатываемый плацентой во время беременности. ХГ появляется в сыворотке крови и моче начиная с 7-13 дня после оплодотворения яйцеклетки. Интактная молекула ХГ состоит из двух нековалентно связанных полипептидных цепей – α - и β -субъединиц. Измерение интактного ХГ и его α -цепи ХГ дает сходные результаты в крови и моче; в то же время данные измерения концентрации β -цепи значительно отличаются. Во время беременности уровни интактного ХГ и его свободной β -цепи (св β -ХГ) достигают своего максимума на 8–9 неделе, а потом постепенно снижаются. Во втором триместре беременности в сыворотке крови уровень интактного ХГ варьирует в пределах от 20 до 50 МЕд/мл (примерное соотношение 1 нг = 15 МЕд); концентрации СВОБОДНЫХ α - и β - цепей составляют не более 0.5-1% от содержания интактного ХГЧ в течение всей беременности. Во время беременности уровни интактного ХГ и св β -ХГ достигают своего максимума на 8–9 неделе, а потом постепенно снижаются. Недавно показано, что при трисомии 21 хромосомы наблюдается значительное увеличение концентрации св β -ХГ по сравнению с контролем. В сочетании с определением других маркеров (АФП, ПАББ-А) определение св β -ХГ может использоваться для оценки риска развития врожденных аномалий плода. В онкологии определение интактного ХГ и свободных субъединиц не является полезным маркером нетрофобластических опухолей, однако абсолютное увеличение концентрации св β -ХГ может указывать на рост хориокарциномы в отличие от нормальной беременности.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение свободной β субъединицы ХГ основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к свободной β субъединице ХГ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание св β ХГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к β субъединице ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации свободной β субъединицы ХГ в исследуемом образце. Концентрацию свободной β субъединицы ХГ в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания свободной β субъединицы ХГ в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование мышиных моноклональных антител к свободной β субъединице ХГ позволяет достичь высокой специфичности анализа

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания св β ХГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «св β ХГ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации св β ХГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей св β ХГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10–250 нг/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации св β ХГ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «св β ХГ-ИФА» концентрация св β ХГ в сыворотке (плазме) крови не превышает 2 нг/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P235Z	SORB MTP	Пластиш 96-луночнй полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C235Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества свободной β субъединицы ХГ – 0 ; 10 ; 50 ; 120 ; 250 нг/мл , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости зеленого цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q235Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сывотки крови человека с известным содержанием свободной β субъединицы ХГ, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T235Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5 S011Z2	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (22 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стол-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K235I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «свХГ-ИФА»	1	шт.	-
11 K235Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «свХГ-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

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. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 20–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «свβХГ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации свободной β субъединицы ХГ в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация свРХГ в исследуемом образце превышает 250 нг/мл, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z2). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки планшета по 100 мкл ИФА-Буфера.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 20 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз .
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержащее лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.

Продолжение таблицы на стр. 8

13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация сврХГ в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (апроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание сврХГ в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций сврХГ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (2 нг/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (250 нг/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация сврХГ ниже 2 нг/мл или выше 250 нг/мл.

10.2. Ожидаемые значения и нормы для первого триместра беременности при расчете риска синдрома Дауна. Приведенные ниже медианы получены на основе анализа 2108 сывороток крови беременных женщин – жительниц Санкт-Петербурга и Ленинградской области – в НИИ акушерства и гинекологии им. Отта с помощью данного набора.

Приведенные в таблице значения имеют рекомендательный характер и могут использоваться для расчета риска синдрома Дауна только на этапе накопления собственных медиан в каждой лаборатории. Значения медиан могут отличаться в различных географических зонах ввиду расовых и популяционных особенностей.

Беременные, неделя	Медиана, нг / мл	СКО
9 неделя	64.3	0.67
10 неделя	62	0.62
11 неделя	49.2	0.64
12 неделя	39.5	0.60
13 неделя	39	0.64

10.3. Ожидаемые значения и нормы для второго триместра беременности при расчете риска синдрома Дауна

Приведенные ниже данные получены на основе анализа 644 сывороток крови беременных женщин – жительниц Санкт-Петербурга и Ленинградской области – в лабораториях ООО «ХЕМА». Сроки беременности были определены по дате последней менструации и округлены до целого.

Приведенные в таблице данные имеют рекомендательный характер и не предназначены для расчета риска синдрома Дауна.

Исследуемая группа	Единицы, нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Беременные:		
неделя 14	21.8	31
неделя 15	20.3	28
неделя 16	13.3	23
неделя 17	11.1	19.9
неделя 18	9.9	19.4

Медианы и СКО (рекомендуемый диапазон норм 0.5–2.0 МОМ)

По мере накопления новых данных о медианах данные будут уточняться – высылайте запросы на адрес rqc@xema.ru. Для расчета риска синдрома Дауна с учетом данных других параметров первого триместра рекомендуется использовать программу КРСД-ХЕМА.

11. ЛИТЕРАТУРА

- Schaelike M, Kossakiewicz M, Kossakiewicz A, Schild RL Examination of a first-trimester Down syndrome screening concept on a mix of 11,107 high- and low-risk patients at a private center for prenatal medicine in Germany. // Ultrasound Obstet Gynecol. 2009 May;33(5):518-23
- Wortelboer EJ, Koster MP, Stoutenbeek P, Elvers LH, Loeber JG, Visser GH, Schielen PC. First-trimester Down syndrome screening performance in the Dutch population; how to achieve further improvement? // Prenat Diagn. 2009 Mar 17. [Epub ahead of print]
- Linskens IH, Levitus M, Frans A, Schielen PC, van Vugt JM, Blankenstein MA, Dijkstra Bloem HM. Performance of free β -human chorionic gonadotrophin (free β -hCG) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) analysis between Delfia Xpress and AutoDelfia systems in The Netherlands. // Clin Chem Lab Med. 2009;47(2):222-6
- Schmidt P, Staboulidou I, Soergel P, Wßstemann M, Hillemanns P, Scharf A. Comparison of Nicolaides' risk evaluation for Down's syndrome with a novel software: an analysis of 1,463 cases. // Arch Gynecol Obstet. 2007 Jun;275(6):469-74. Epub 2007 Mar 1
- Spencer K. Accuracy of Down's syndrome risks produced in a prenatal screening program. // Ann Clin Biochem. 1999 Jan;36 (Pt 1):101-3.

По вопросам, касающимся качества Набора «свВХГ-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105043, Москва, а/я 58, тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный) электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА», к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF free β -HCG IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of free β -HCG in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of free β -HCG in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Human chorionic gonadotropin (HCG) is a glycoprotein hormone secreted by trophoblastic cells of placenta during pregnancy. HCG appears in blood and urine in about 7-13 day after fertilization, reaching its maximum by the end of the first trimester. An intact molecule of HCG consists of two non-covalently bound polypeptide chains: α - and β -subunits. β -subunit is specific for HCG hormone while α -chain is identical in TSH, LH, FSH and HCG..

Normally, blood levels of free α - and β -chains reach not more than 0.5-1.0% of intact HCG level and during pregnancy vary in parallel with intact HCG. Recently, it was shown that, compared to control, a significant elevation of free β -chain is found in trisomy 21 (Down syndrome), the most pronounced difference being found during weeks 8-9 of pregnancy. That is why determination of free β -chain of HCG in conjunction with other markers (PABB-A, AFP) may be used to estimate risk of congenital pathology of the fetus.

In oncology, a marked rise of free β -chain in blood is found in trophoblastic and germinal tumours (choriocarcinoma, carcinoma of ovaries, etc.).

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human free β HCG-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies - murine monoclonal to human β HCG, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H_2SO_4 . It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	freeβ-HCG EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2 CAL 1-5	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 10; 50; 120; 250 ng/ml	5	pcs	green (C1 – colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ HRP	Conjugate, 11 ml	1	pcs	purple	until exp.date
5 DIL	EIA buffer 22 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7 BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution at 1 month at +2/+8 °C or 5 days at RT
8 STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K2351	Instruction freeβ-HCG EIA	1	pcs		N/A
11 K235Q	QC data sheet freeβ-HCG EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using EIA buffer. Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Pipet 100 µl of EIA buffer into each well.
4	Pipet 20 µl of calibrators CAL 1–5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 30 minutes at 37 °C .
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
7	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
8	Incubate 30 minutes at 37 °C .
9	Wash the strips 5 times.
10	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
11	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
12	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
13	Measure OD (optical density) at 450 nm.
14	Set photometer blank on first calibrator
15	Apply point-by-point method for data reduction.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

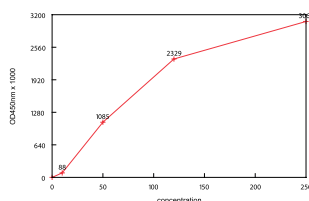
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus free β -HCG concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of free β -HCG in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 ng/ml	0.05
CAL 2	10 ng/ml	0.14
CAL 3	50 ng/ml	1.13
CAL 4	120 ng/ml	2.38
CAL 5	250 ng/ml	3.12



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for free β -HCG. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Pregnancy, week	Median, ng/ml	SKO
9	64.3	0.67
10	62	0.62
11	49.2	0.64
12	39.5	0.60
13	39.0	0.64

Sex, age	Units, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit
Pregnancy week:		
14	21.8	31
15	20.3	28
16	13.3	23
17	11.1	19.9
18	9.9	19.4

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

The monoclonal antibody is specific for human free β -HCG. There is no cross-reactivity to other species.

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 2 ng/ml.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different free β -HCG concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known free β -HCG concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. Schaelike M, Kossakiewicz M, Kossakiewicz A, Schild RL Examination of a first-trimester Down syndrome screening concept on a mix of 11,107 high- and low-risk patients at a private center for prenatal medicine in Germany. // *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 May;33(5):518-23
2. Wortelboer EJ, Koster MP, Stoutenbeek P, Elvers LH, Loeber JG, Visser GH, Schielen PC. First-trimester Down syndrome screening performance in the Dutch population; how to achieve further improvement β // *Prenat Diagn.* 2009 Mar 17. [Epub ahead of print]
3. Linskens IH, Levitus M, Frans A, Schielen PC, van Vugt JM, Blankenstein MA, Dijstelbloem HM. Performance of free β -human chorionic gonadotrophin (free β -hCG) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) analysis between Delfia Xpress and AutoDelfia systems in The Netherlands. // *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):222-6
4. Schmidt P, Staboulidou I, Soergel P, Wßstemann M, Hillemanns P, Scharf A. Comparison of Nicolaides' risk evaluation for Down's syndrome with a novel software: an analysis of 1,463 cases. // *Arch Gynecol Obstet.* 2007 Jun;275(6):469-74. Epub 2007 Mar 1
5. Spencer K. Accuracy of Down's syndrome risks produced in a prenatal screening program. // *Ann Clin Biochem.* 1999 Jan;36 (Pt 1):101-3.