

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення вільної β-субодиниці хоріонічного гонадотропіну людини
(β-ХГл вільний-БЕСТ)

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «β-ХГл вільний-БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення вільної β-субодиниці хоріонічного гонадотропіну людини у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «β-ХГл вільний-БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

2. СКЛАД НАБОРУ

Планшет - полістирольний, з іммобілізованими моноклональними антитілами до вільної β-ХГл **1 упаковка.**

Кон'югат – анти - β-ХГл - пероксидаза **1 флакон, 14 мл**

Калібрувальні проби (КП), атестовані за міжнародним стандартом WHO IRP 75/551:

комплект

КП№1- 1 флакон, 1 мл, містить 0 нг/мл вільна β-ХГл,

КП№2- 1 флакон, 1 мл, містить 10 нг/мл вільна β-ХГл,

КП№3- 1 флакон, 1 мл, містить 25 нг/мл вільна β-ХГл,

КП№4- 1 флакон, 1 мл, містить 50 нг/мл вільна β-ХГл,

КП№5- 1 флакон, 1 мл, містить 100 нг/мл вільна β-ХГл,

КП№6- 1 флакон, 1 мл, містить 200 нг/мл вільна β-ХГл,

примітка: точні номінали каліброваних проб зазначені на етикетках флаконів і в паспорті до набору реагентів.

КС (контрольна сироватка) містить відому кількість β-ХГл, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону. **2 флакона , 1 мл**

Промивочний розчин, концентрований водно-сольовий розчин для промивання. **1 флакони, 30 мл**

РРС (розчин для розведення зразків сироватки крові) **1 флакон , 14 мл**

ТМБ (розчин тетраметилбензидину) **1 флакон, 14 мл**

Стоп-реагент **1 флакон, 14 мл**

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість. Мінімальна достовірно обумовлена набором концентрація вільної β - ХГч в сироватці крові людини не перевищує 2 нг/мл.

3.2. Специфічність. Антитіла , іммобілізовані на твердій фазі , мають 100 % специфічністю до.

3.3. Діапазон очікуваних значень.

Таблиця 1

Тиждень вагітності	День вагітності	Медіана (sst) [нг/мл] Незалежно від ваги	Медіана тижні [нг/мл]
8	59	124.8	117.4
9	66	101.4	97.6
10	73	82.3	84.6
11	80	66.9	73.4
12	87	54.3	60.1
13	94	44.1	36.0

Значення медіани, розраховується для кожного терміну вагітності, залежить від багатьох факторів: специфічності метода, особливостей досліджуваної популяції, точності метода в конкретній лабораторії. Для цього кожній лабораторії рекомендується використовувати данні виробником значення медіан тільки до тих пір, поки спеціалістами лабораторії не будуть визначенні медіани, характерні для конкретної популяції в місці розташування.

Примітка: значення концентрацій калібрувальних проб зазначені в нг/мл. Для перерахунку в мМО\мл необхідно використовувати співвідношення: 1 нг/мл = 1 мМО/мл.

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

4.1. При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не пікетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства

5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

6.1. Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для венозної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку.

6.2. Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

6.3. Зразки сироватки крові слід використати протягом 24 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче -20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ.

7.1 . Підготовка реагентів

7.1.1 . Стріпи . Перед розкриттям пакет зі стріпами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стріпів .

7.1.2 . Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів легким постукуванням струсити частинки , які прилипли до стінок флаконів або до кришок . Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальною пробою та контрольної сироваткою внести по 1 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) без перемішування . Потім , акуратно нахилиючи і обертаючи флакони , перемішати їх вміст до повного розчинення , уникаючи піноутворення . Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі , періодично перемішуючи.

7.1.3 Кон'югат готовий до використання.

7.1.4 Розчин для промивання. Необхідна кількість промиваючого розчину розвести дистильованою водою в 40 разів.

Наприклад:

30 мл промиваючого розчину + 1170 мл дистильованої води.

Ретельно перемішати , уникаючи піноутворення .

7.1.5. Розчин тетраметилбензидину (ТМБ) готовий до використання.

7.1.6 . Стоп - реагент готовий до використання.

7.1.7 . Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури.

7.1.8 . Розведення досліджуваних зразків сироваток крові. Якщо за результатами аналізу (див. п. 9.3 .) значення концентрації вільної β - ХГч в досліджуваних зразках **вище КП № 6** , зразки слід розвести **PPC** в 10 або 100 разів.

Приклад підготовки зразка до аналізу:

1:10 90 мкл PPC + 10 мкл досліджуваного зразка.

При кожному розведенні необхідно ретельне перемішування .

7.2 . Постановка аналізу

7.2.1 . Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином :

A1 , A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ ;

B1 , B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1 ;

C1 , C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2 ;

D1 , D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3 ;

E1 , E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4 ;

F1 , F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5 ;

G1 , G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6 ;

H1 , H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини контрольної сироватки.

7.2.2 . У всі лунки , крім лунок A1 і A2 , внести по 100 мкл PPC.

7.2.3 . Внести у відповідні лунки по 50 мкл калібрувальних проб та контрольні сироватки , в що залишилися лунки - по 50 мкл досліджуваної сироватки крові в дублях .

Примітка: загальний час внесення калібрувальних проб , контрольної сироватки і досліджуваних сироваток крові не повинен перевищувати 15 хвилин , інакше час інкубації різних зразків буде значно відрізнятися , що призведе до неправильних результатів .

7.2.4 . Інкубувати стріпи протягом 30 хвилин при температурі +37 ° С .

7.2.5 . По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки 5 разів. При кожній промивці в усі лунки додати по 400 мкл розчину для промивання , приготованого за п. 7.1.4 . Струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з

наступним декантування . Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу .

Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного пристрою.

7.2.6 . У всі лунки , крім лунок А1 і А2 , внести по 150 мкл кон'югату .

7.2.7 . Інкубувати стріпи протягом 30 хвилин при температурі +37 ° С .

7.2.8 . Після закінчення другої інкубації видалити вміст лунок декантуванням і промити лунки згідно п. 7.2.5 .

7.2.9 . негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ . Інкубувати стріпи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) протягом 20 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення.

7.2.10 . Додати в усі лунки з тією ж швидкістю і в тій же послідовності , як і розчин ТМБ , по 100 мкл стоп- реагенту для зупинки ферментної реакції , перемішати на шейкері протягом 1-2 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С)

7.2.11 . Якщо неможливо виміряти оптичну густина у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.10 . , тоді слід мати на увазі , що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при температурі +18 ... 25 ° С .

8 . РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти на фотометрі вертикального сканування оптичну густина у лунках при довжині хвилі 450 нм .

При реєстрації результатів необхідно віднімати величину оптичної густини в лунках А1 і А2 з значень оптичної густини всіх інших лунок .

Примітка: середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках А1 і А2 не повинно перевищувати 0,09 од. ОГ .

9 . ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

9.1 . Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації вільної β - ХГч (нг/мл) в калібрувальних пробах (Малюнок 1) . Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення осей .

Примітка: для побудови калібрувального графіка на масштабному папері необхідно використовувати дані оптичної густини після вирахування з них середньої величини оптичної густини лунок з ТМБ .

Якщо програма фотометра не дозволяє віднімати величину оптичної густини лунок А1 і А2 , то необхідно користуватися формулою :

$V - VT$,

де V - середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках , що містять калібрувальні або досліджувані проби;

VT - середнє арифметичне значення оптичної густини лунок А1 і А2 .

9.2 . Визначити вміст вільної β - ХГч в пробах за калібрувальним графіком . У разі додаткового розведення зразків необхідно виміряну концентрацію вільної β - ХГч помножити на коефіцієнт розведення .

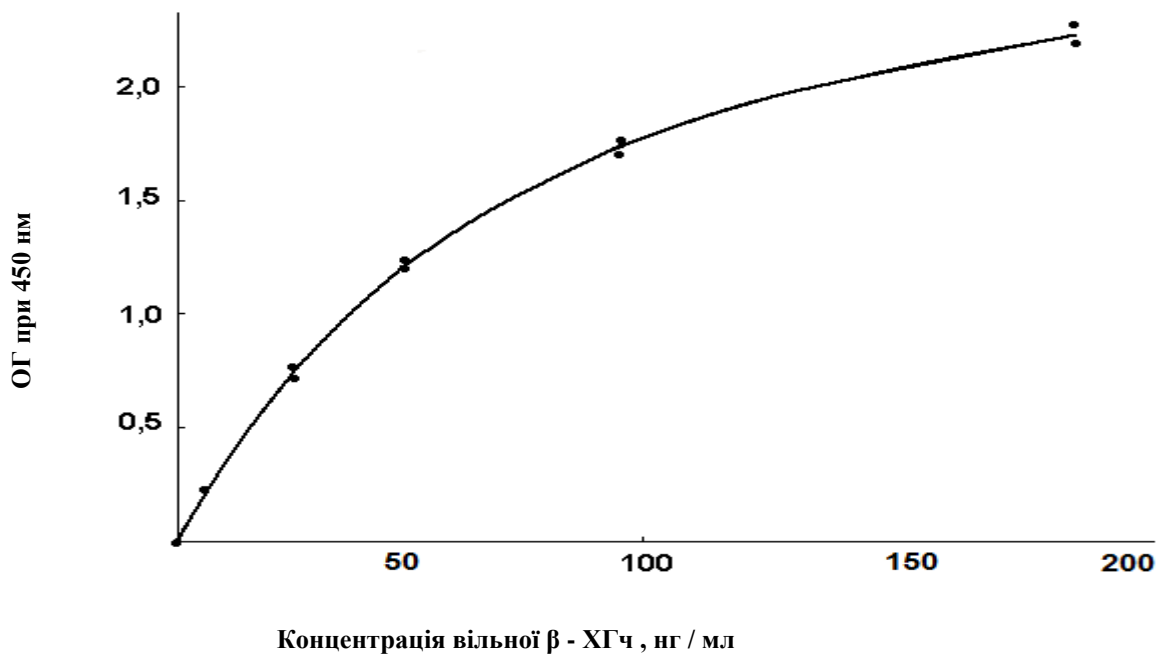
9.3 . Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації вільної β - ХГч , що перевищують номінал КП № 6 , **не допускається!!!** . Для точного визначення концентрації вільної β - ХГч в таких зразках необхідно виконати їх розведення у відповідності з п. 7.1.9 .

9.4 . Для розрахунку ризику в пренатальному скринінгу результати вимірювання вільної β - ХГч вказуються в MOM (multiple of medians) і обчислюються за формулою:

$$\text{MOM} = \text{Виміряна концентрація (вільна } \beta \text{ - ХГч)} / \text{Медіана (вільна } \beta \text{ - ХГч)} .$$

9.5 . Для автоматизованого розрахунку ризику синдрому Дауна можна скористатися спеціальним програмним забезпеченням .

Малюнок . Типовий калібрувальний графік



10 . УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промиваючий розчин підготовлений до використання зберігати не більш 5 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.