

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення хоріонічного гонадотропіну людини (ХГл–БЕСТ)

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «ХГл–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення хоріонічного гонадотропіну людини у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «ХГл–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 ХГл **1 упаковка.**

Кон'югат – анти - ХГл - пероксидаза **1 флакон**

Калібрувальні проби (КП): **комплект**

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 МО/л ХГл,

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, містить 15 МО/л ХГл,

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, містить 50 МО/л ХГл,

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, містить 125 МО/л ХГл ,

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, містить 250 МО/л ХГл,

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, містить 500 МО/л ХГл .

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

КС (контрольна сироватка) містить відому кількість

ХГл, діапазон концентрації зазначений на етикетці флакону. **1 флакон**

РРС (Розчин для розведення зразків сироватки крові), водно-сольовий розчин,, **1 флакон**

Промиваючий розчин, концентрований водно-сольовий розчин для промивання. **1 флакон**

ТМБ (Розчин тетраметилбензидина) **1 флакон**

СР (Стоп-реагент) **1 флакон**

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість. Мінімальна достовірно обумовлена набором концентрація ХГл в сироватці крові людини не перевищує 5 МО/л.

3.2. Діапазон очікуваних значень.

Концентрація ХГл у здорових донорів чоловічої та жіночої статі у віці 18-40 років не перевищує 10 МО/л.

У вагітних на різних термінах з відповідними рекомендованими розведеннями аналізованих сироваток перед проведенням досліджень очікувані значення відповідно Таблиці 1.

Таблиця 1

Термін вагітності (повних тижнів)	Медіана ХГл, МО/л	Толерантні межі, МО/л	Рекомендоване розведення сироватки крові
2	150	50–300	без розведення
3–4	2 000	1 500–5 000	1:20
4–5	20 000	10 000–30 000	1:400
5–6	50 000	20 000–100 000	1:400
6–7	100 000	50 000–200 000	1:400 і 1:2000
7–8	80 000	40 000–200 000	1:400 і 1:2000
8–9	70 000	35 000–140 000	1:400
9–10	65 000	32 500–130 000	1:400
10–11	60 000	30 000–120 000	1:400
11–12	55 000	27 500–110 000	1:400
13–14	50 000	25 000–100 000	1:400
15–16	40 000	20 000–80 000	1:400
17–21	30 000	15 000–60 000	1:400

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 дані виробником значення медіан тільки до тих пір, поки спеціалістами лабораторії не будуть визначені медіани, характерні для конкретної популяції в місці розташування.

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

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:

Спектрофотометр, 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 використовувати 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 прилипили до стінок флаконів або до кришок . Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальною пробію та контрольної сироваткою внести по 0,5 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. Витрата кон'югату на один стріп становить 1,5 мл .

7.1.4 . РРС готовий до використання.

7.1.5 . Розчин для промивання . Необхідна кількість промиваючого розчину розвести дистильованою водою в 20 разів.

Наприклад:

5 мл промиваючого розчину + 95 мл дистильованої води. Ретельно перемішати , уникаючи піноутворення .

7.1.6 . Розчин тетраметилбензидину (ТМБ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стріп становить 1,15 мл

7.1.7 . Стоп - реагент готовий до використання. Витрата стоп- реагенту на один стріп становить 1,15 мл .

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

7.1.9 . Розведення досліджуваних зразків сироваток крові. Якщо за попередніми даними або за результатами аналізу (див. п. 9.3 .) Значення концентрації ХГл в досліджуваних зразках вище КП № 6 , зразки слід розвести РРС в 20, 400, 2000 разів (див. Таблицю 1):

Зразок № 1 (розведення в 20 разів) :

190 мкл РРС + 10 мкл досліджуваного зразка.

Зразок № 2 (розведення в 400 разів) :

190 мкл РРС + 10 мкл зразка № 1 .

Зразок № 3 (розведення в 2000 разів) :

160 мкл РРС + 40 мкл зразка № 2.

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 150 мкл кон'югату.

7.2.3 . Внести у відповідні лунки по 50 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, усі інші лунки – по 50 мкл досліджувані 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 60 хвилин при струшуванні в термо- шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю

500-800 об / хв або 120 хвилин при температурі +37 ° С.

7.2.5 . По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезинфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки п'ять разів. При кожній промивці в усі лунки додавати по 300 мкл розчину для промивання , приготованого за п. 7.1.5 . , Струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з наступним декантуванням. 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 промивання пристрою.

7.2.6 . Негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ . Інкубувати стріпи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) протягом 15-30 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термо- шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв .

7.2.7 . 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)

7.2.8 . Якщо неможливо виміряти оптичну густина у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.7 . , то слід мати на увазі , що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при кімнатній температурі.
Примітка: максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу . Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од. ОГ.

8 . РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти на спектрофотометрі 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 ХГл (МО/л) 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 :

$$V - V_T,$$

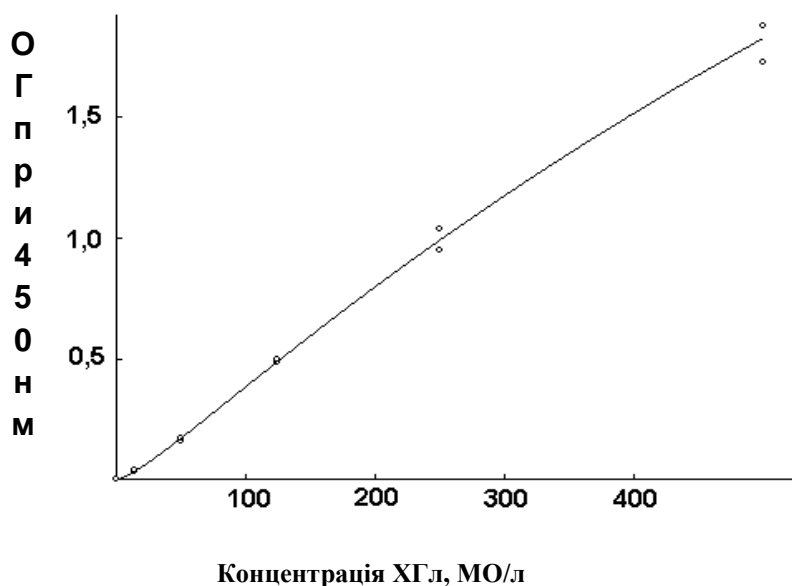
де V - середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках , що містять калібрувальні або досліджувані проби;

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

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

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

Малюнок 1 . Типовий калібрувальний графік



10 . УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб.
Не допускати заморожування!

Промиваючий розчин, підготовлений до використання, зберігати не більш 5 діб.

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертається: 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.

СХЕМА ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

№	Стадія	Реагенти	Температура	Час	Примітка
1	Внесення реагентів	150 мкл кон'югату	КТ(+18...25°С)	Внесення КП,КС не більше 15 досліджуваних зразків	В лунки для виявлення ОГ ТМБ нічого не вносити
2		50 мкл КП і КС			
3		50 мкл досліджуваних зразків			
4	Інкубація	-	+37°С	60	Термо- шейкер , 500-800 об/хв.
			+37°С	120	термостат
5	Промивка	300 мкл в лунку 1*промив. розчину (5 разів)			1*промив. розчину =14 мл промив. розчину +266 мл Н2О
6	Внесення хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Інкубація с ТМБ	-	КТ	15-30	В темноті
			+37°С	10	Термо-шейкер , 500-800 об/хв
8	Зупинка ферментної реакції	100 мкл стоп-реагент			
9	Змішування	-	КТ	1-2	Шейкер
10	Реєстрація результатів	-		В перебігу 20 після зупинки ферментної реакції	Фотометр, 450 нм
11	Обробка результатів	-			Калькулятор і масштабний папір /відповідно ПО

Примітки:

КП - калібрувальна проба;

КС - контрольна сироватка;

ОГ - оптична густина;

RT - кімнатна температура (+18 ... 25 ° С);

ПЗ - програмне забезпечення.