

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ХОРІОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ ЛЮДИНИ (hCG)

825-300, β -Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Test System

Каталог. №: 825-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 06-11-2012

Версія 3



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

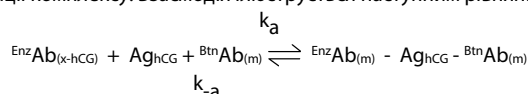
Тест призначений для кількісного визначення Хоріонічного Гонадотропіну людини (hCG) в людській сироватці.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до hCG. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген hCG, між hCG антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{hCG} = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(x-hCG)}$ = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(hCG)} - \text{Ag}_{hCG} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

$\text{EnzAb}_{(x-hCG)} - \text{Ag}_{hCG} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}} \Rightarrow$ іммобілізований комплекс,

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

А. Калібратори hCG – 1 мл/флакон

6 флаконів референсної сироватки (стандартів) з концентраціями hCG 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) і 250 (F) мМОд/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консерванти.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки прокалібровані по Міжнародному стандарту WHO IRP 75/537.

В. Ферментний реагент hCG – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені афінно очищені мишачі моноклональні антитіла та біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

С. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

Д. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

Е. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

Ф. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

Г. Стоп-розчин – 8.0 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-30 °С.

Н. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для вишування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.05 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю, відповідні гіпо-, гіпер і еутиреоїдному діапазонам для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту hCG у кожен лунку.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації hCG в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації hCG в мМОд/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації hCG в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1/745 перетинає стандартну криву при 157 мМОд/мл (див. мал.1)

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація
Калібратор А	A1	0,002	0,004	0
	B1	0,005		
Калібратор	C1	0,073	0,071	5

В	D1	0,069		
Калібратор С	E1	0,340	0,350	25
	F1	0,360		
Калібратор D	G1	0,637	0,650	50
	H1	0,663		
Калібратор E	A2	1,223	1,212	100
	B2	1,199		
Калібратор 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		
Зразок	A3	1,736	1,745	157
	B3	1,754		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1 (Див. оригінал інструкції).

11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібатора «F» повинен бути ≥ 1.3
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки з концентраціями hCG понад 250 мМОд/мл необхідно розвести нормальною чоловічою сироваткою (hCG < 1 мМОд/мл) і проаналізувати повторно. Результат помножити на фактор розведення.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

6. Можуть бути отримані хибно позитивні результати при наявності широкого діапазону трофобластичних та не трофобластичних пухлин, про продукують hCG. Виходячи з цього, необхідно виключити неоплазми, що секретуються hCG, перед підтвердженням вагітності.
7. Також хибно позитивні результати можуть спостерігатися при аналізі зразків від пацієнтів, що приймають лікарські препарати Пергонал і Кломід.
8. При спонтанних мікроабортах і ектопічних вагітностях спостерігатимуться значення, нижчі від очікуваних, при нормальній вагітності, в той же час завищені значення часто спостерігаються при багатоплідних вагітностях.
9. Після терапевтичного абортів hCG, які виявляються, можуть спостерігатися протягом трьох-чотирьох тижнів.
10. **Само по собі значення hCG не є діагностичною величиною і повинно використовуватися разом з іншими клінічними даними.**

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження дорослої нормальної популяції цим набором і отримані наступні результати.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тесту hCG (в мМОд/мл)

Кількість	25
Середнє	2.9
Стандартне відхилення	1.4
Очікувані діапазони	0.1 – 5.7

ТАБЛИЦЯ 2

Очікувані значення для рівнів hCG нормальної вагітності в мМОд/мл (3-й IS 75/537)

1-ий тиждень	10-30
2-ий тиждень	30-100
3-ій тиждень	100-1000
4-ий тиждень	1000-10000
2-3 місяць	30,000-100,000
2-й триместр	10,000 - 30,000
3-й триместр	5,000-15,000

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору hCG всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 3 і 4.

ТАБЛИЦЯ 3

Точність в аналізі (мМОд/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	4.4	0.22	4.9
Рівень 2	20	18.7	0.75	4.0
Рівень 3	20	214.8	14.59	6.8

ТАБЛИЦЯ 4

Точність між аналізами* (мМОд/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	5.4	0.52	9.6
Рівень 2	20	22.4	1.97	8.8
Рівень 3	20	213.1	15.16	7.1

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.003 мМОд/лунку. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.102 мМОд/мл для даного набору.

14.3 точність

Цей метод hCG ELISA був порівняний з радіоімунним методом. Порівнювалися зразки від невагітних і вагітних жінок. Загальна кількість

зразків складо 110. Квадратичне рівняння регресії і коефіцієнт кореляції були обчислено для hCG ELISA в порівнянні з методом порівняння. Отримані дані показані в Таблиці 5.

ТАБЛИЦЯ 5

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	14.8	$Y=0.081+0.93(x)$	0.989
Метод порівняння	15.1		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референс-методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл до hCG з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою hCG, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
ХГЛ	1.0000	---
hCG субодиниця	< 0.0001	1000 нг/мл
ФСГ	< 0.0001	1000 нг/мл
ЛГ	< 0.0001	1000 нг/мл
ТТГ	< 0.0001	1000 нг/мл



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

