

НАБІР РЕАГЕНТІВ

БЕТА ХГЛ (ХОРИОНІЧНИЙ ГОНАДОТРОПІН ЛЮДИНИ-БЕТА) ELISA

β-HCG ELISA

Каталог. №: EIA-1911

Дата випуску інструкції: 2020-12-17
Версія 9.0



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір **DRG Бета ХГЛ** – це ферментний імуноаналіз для кількісного in vitro діагностичного визначення загального хоріонічного гонадотропіну людини (HCG та b-hCG) в сироватці.

Цей набір НЕ призначений для оцінки ризику трисомії 21.

1.1 Короткий опис та пояснення

Хоріонічний гонадотропін людини (ХГЛ) – глікопротеїновий гормон, який звичайно виробляється плацентою під час вагітності. Після запліднення рівень ХГЛ різко зростає і досягає максимуму до кінця першого триместру. Високі концентрації спостерігаються під час всієї вагітності. Після народження рівень ХГЛ в сироватці швидко зменшується і до кількох днів досягає величин, що не піддаються визначенню.

Молекула ХГЛ складається з альфа-і бета-субодиниць. Альфа-субодиниця майже ідентична з альфа-субодиницями інших глікопротеїнових гормонів, таких як Тиреоїд Стимулюючий Гормон (ТТГ), Лютеїнізуючий Гормон (ЛГ) і Фолікулостимулюючий Гормон (ФСГ); різниця в бета-субодиницях цих гормонів відповідає їхній біологічній функції і з нею зв'язана імунологічна специфічність.

Моноклональні антитіла, що розпізнають унікальні сайти в бета-ланцюзі молекули бета-ХГЛ/ХГЛ, є необхідними для диференціації між ХГЛ та ЛГ, ФСГ та ТТГ.

Специфічні аналізи на бета-ХГЛ дозволяють раннє діагностування вагітності.

Також, до підвищеного рівня ХГЛ під час вагітності, високі концентрації бета-ХГЛ/ХГЛ можуть бути пов'язані з новоутвореннями трофобластичного та нентрофобластного походження, такими як гідатиформна родимка, хоріонепітеліома, ембріонально-клітинний рак, семінома та багато інших.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір є твердофазним ферментнозв'язаним імуносорбентним аналізом (ELISA), створеним **за принципом "сендвіча"**.

Мікротитрові лунки покриті моноклональним антитілом (миші), спрямованих проти антигенів на молекулі бета-ХГЛ. Аліквота зразка пацієнта, що містить ендogenous бета-ХГЛ та/або ХГЛ інкубується у лунці разом з ферментним кон'югатом, який є антитілом до бета-ХГЛ, кон'югованим з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається водою.

Кількість зв'язаної пероксидази прямо пропорційна концентрації бета-ХГЛ/ХГЛ в зразку. Після додавання розчину субстрату інтенсивність утвореного забарвлення пропорційна концентрації бета-ХГЛ/ХГЛ у зразку пацієнта.

3. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання in vitro.
2. Усі реактиви цього тестового набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані затвердженнями процедурами FDA та підтвержені, що є негативними на ВІЛ I/II, HBsAg та HCV. Однак, усі реактиви слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку під час використання та утилізації.
3. Перед початком аналізу, повністю та уважно прочитайте інструкцію. Використовується актуальна версія інструкції, яка постачається в наборі. Будьте впевнені, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет містить відривні смужки. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2°C до + 8°C в герметичній упаковці і використовуються з рамками, які надаються.
5. Піпетування зразків і реагентів повинно бути зроблено так швидко, як це можливо і в тій же послідовності для кожного кроку.
6. Використовуйте посуд тільки для одного типу реагентів. Особливо, це стосується ємностей із субстратом. Використання ємностей для

дозування розчину субстрату, які раніше використовувалися для розчинів кон'югату, може спричинити забарвлення розчину. Не зливайте реактиви назад у флакони, може відбутися забруднення.

7. Ретельно перемішати вміст лунок мікропланшетів, щоб забезпечити гарні результати тестування. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу, додайте реактиви відразу після завершення промивання.
9. Довести реактиви до кімнатної температури (21-26 °C) перед початком тесту. Температура впливає на абсорбцію зчитування тесту. Проте, не впливає на значення для зразків пацієнтів.
10. Не піпетуйте реактиви ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не паліть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реактиви.
12. Одягайте рукавиці під час роботи зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати фальшиві результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реактиви після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні відкаліброваних піпеток та мікротитрових планшетних зчитувачів.
16. Не змішуйте та не використовуйте компоненти з наборів з різними номерами партій. Рекомендується не міняти лунки різних планшетів навіть однієї партії. Можливо, набори були відвантажені або зберігалися за різних умов, і характеристики зв'язування планшетів можуть дещо відрізнятись.
17. Уникайте контакту зі Стоп-розчином (0.5 M H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
18. Деякі реактиви містять проклін 300, БНД та/або МІТ в якості консервантів. У разі попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. ТМБ субстрат має подразнюючу дію на шкіру і слизову оболонку. У разі можливого контакту, промийте очі і шкіру великою кількістю води з милом. Промийте забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні, виведіть людину на свіже повітря.
20. Хімічні речовини і приготовлені чи використані реактиви повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів. Паспорт Безпеки доступний за запитом безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок, покритих антитілом (моноклональним) проти бета-ХГЛ.
2. **Стандарт (0-5)**, 6 фл. (ліофілізовані), 1 мл.
Концентрації: 0, 5, 25, 50, 100, 200 мМО/мл.
Конверсія: (1 пг/мл=0,00916 мМО/мл)
Стандарти відкалібровані відповідно до наступного референсного матеріалу: 5-й Міжнародний стандарт ВООЗ хоріонічного гонадотропіну, код NIBSC: 07/364.
Див. "Приготування реагентів";
Містять не ртутний консервант.
3. **Розчинник зразків**, 1 фл., 10 мл, готовий до використання.
Містить нертутний консервант.
4. **Ферментний кон'югат**, 1 фл. 11 мл, готовий до використання.
Анти-бета-ХГЛ-антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому.
Містить нертутний консервант.
5. **Розчин субстрату** - ТМБ, 1 фл., 14 мл, готовий до використання, тетраметилбензидин (ТМБ).
6. **Стоп розчин**, 1 фл., 14 мл, готовий до використання, містить 0.5 M H₂SO₄.
Уникайте контакту зі стоп розчином, оскільки він може викликати подразнення та опіки.

Примітка: Додатковий розчинник зразків для розведення зразків доступний за запитом.

4.2 Обладнання та матеріали, які не постачаються

- Відкалібрований планшет-рідер (450 нм, з референсною довжиною хвилі при 620 нм та 630 нм)
- Відкалібровані регульовані високоточні мікропіпетки
- Абсорбуючий папір
- Дистильована вода.
- Таймер
- Напівлогарифмічний папір або ПЗ для обробки даних

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °C закриті реагенти зберігатимуть реактивність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти повинні зберігатись при 2-8 °C. Мікротитрові лунки повинні зберігатись при 2-8 °C. Після відкриття мішечка треба знову щільно його закрити.

Відкриті набори зберігають реактивність протягом 8 тижнів, якщо зберігати так, як описано вище.

4.4 Приготування реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти до кімнатної температури.

Стандарти

Розведіть ліофілізований вміст флаконів з 1 мл дистильованої води і залишіть настоюватись протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Перемішайте кілька разів перед використанням.

Примітка: Розведені стандарти стабільні 2 місяці при 2-8°C.
Для більш тривалого зберігання заморозити до -20°C.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору слід проводити відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Паспорті Безпеки, (див розділ 13).

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника на протязі одного тижня після отримання продукту. Сильно пошкодженні компоненти не слід використовувати. Їх потрібно зберігати поки не буде остаточного рішення. Після цього їх слід утилізувати відповідно до офіційних вимог.

5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

В цьому аналізі необхідно використовувати сироватку.

Примітка: В аналізі не варто використовувати зразки з вмістом азиду натрію.

Не використовуйте в аналізі гемолізовані, іктеричні, або ліпемічні зразки. Для подальшої інформації дивитися розділ «Інтерферуючі речовини».

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Збирайте кров, шляхом венепункції (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дозвольте їй згорнутись, і відокремте сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугувати, якщо не відбулося повне згортання. Для зразків пацієнтів, які отримують антикоагулянтну терапію, необхідно більше часу для згортання.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закриті і зберігатись до 7 днів при 2-8°C. Для довшого зберігання (до 12 місяців) зразки повинні бути заморожені до -20° C. Розморожені зразки необхідно кілька разів легко інвертувати перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі, зразок сироватки показує значення вище, ніж у найвищому стандарті, зразки можуть бути розведені розчинником зразків і проаналізовані повторно, як описано у Процедурі Аналізу.

Приклад:

- Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл розчинника зразків (ретельно перемішайте)
- Розведення 1:100: 10 мкл розведення а)1:10 + 90 мкл розчинника зразків (ретельно перемішайте).
- Розведення 1:1000: 10 мкл розведення б)1:100 + 90 мкл розчинника зразків (ретельно змішайте).

ПРИМІТКА:

сироватку вагітних жінок необхідно розвести 1/100 розчинником зразків перед початком аналізу.

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готово:

ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.

- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура дослідження (кількісний метод)

Кожна процедура повинна містити стандартну криву.

- Закріпіть необхідну кількість Мікротитрових лунок на тримачі.
- Додайте по **25 мкл** кожного **Стандарту, Контролю** і **зразків з новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки;
- Додайте в кожен лунку по **100 мкл Ферментного кон'югату**; Добре перемішайте 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування на даному етапі;
- Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі;
- Різько вилийте вміст лунок; Промийте лунки 5 разів дистильованою водою (400 мкл/лунку); Струсіть лунки на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки вологи.
Важливе зауваження: Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.
- Додайте **100 мкл Розчину субстрату** в кожен лунку;
- Інкубуйте протягом **15 хвилин** при кімнатній температурі;
- Зупиніть ферментативну реакцію додаванням в кожен лунку по **50 мкл Стоп розчину**.
- Визначіть оптичну щільність розчину у кожній лунці при **450 нм (зчитування) та при 620-630 нм (фонове віднімання, рекомендується)** за допомогою мікротитрового зчитувача планшетів.
Рекомендується зчитувати лунки **впродовж 10 хвилин** після додавання **Стоп розчину**.

6.3 Обчислення результатів (кількісне)

- Обчисліть середнє значення оптичної щільності для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-осі проти відповідних концентрацій на Х-осі.
- Використовуючи середнє значення оптичної щільності для кожного зразка, визначіть відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
- Автоматизований метод: Результати в інструкції були визначені автоматично з використанням кривої 4-параметрової логістики (4 Parametr Rodbard 4 Parameter Marquardt - бажаний метод). Інші функції обробки даних можуть дати дещо відмінні результати.
- Концентрацію зразків можливо визначити безпосередньо із стандартної кривої. Зразки з концентраціями вище, ніж найвищий стандарт необхідно надалі розбавляти або відображати як > 200 мМО/мл. Для вираховування концентрацій необхідно взяти до уваги цей коефіцієнт розведення.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані тільки для демонстрації та не можуть використовуватись замість генерації даних під час аналізу.

Стандарт	Оптична щільність (450 нм)
Стандарт 0 (0 мМО/мл)	0,04
Стандарт 1 (5 мМО/мл)	0,15
Стандарт 2 (25 мМО/мл)	0,28
Стандарт 3 (50 мМО/мл)	0,53
Стандарт 4 (100 мМО/мл)	0,94
Стандарт 5 (200 мМО/мл)	1,50

6.4 Процедура аналізу (якісний метод)

Ця процедура дозволяє відрізнити позитивні зразки (вагітні) від негативних, порівнюючи рівні бета-ХГЛ зі **Стандартом 0** (0 мМО/мл) та **Стандартом 3** (50 мМО/мл).

Зразки пацієнта тестуються зі **Стандартом 0** та **Стандартом 50 мМО/мл**. Процедура тесту ідентична з Кількісним Методом, проте кроки 9 і 10 пропущені.

6.5 Обчислення результатів (якісний)

Для якісного аналізу рівнів бета-ХГЛ, інтенсивність забарвлення порівнюється з кольором стандартів 0 і 50 мМО/мл.

Якщо голубе забарвлення зразку менш інтенсивне, ніж колір стандарту 50 мМО/мл, то він вважається негативним.

Якщо інтенсивність голубого забарвлення зразку більша або рівна інтенсивності кольору стандарту 50 мМО/мл, то він вважається позитивним.

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Настійливо рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

7.1 Здорові дорослі в нормі, не вагітні

Дослідження, проведені на здорових дорослих з використанням DRG бета-ХГЛ ELISA, дали наступні результати:

Населення	Вік (в роках)	Фактична к-сть	Бета-ХГ (мМО/мл)
Чоловіки	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
Жінки	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

7.2 Жінки на 2-му триместрі вагітності

Тиждень вагітності	Оцінка зразків	Відсоток 5% (мМО/мл)	Відсоток 95% (мМО/мл)
14	103	10 303	71980
15	96	9 246	51 666
16	91	5 266	36 947
17	14	4 632	24 033

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:

- Для діагностики вагітності в сироватці порогове значення якісного тесту складає 50 мМО/мл. Негативні чи граничні результати повинні бути наново перевірені на свіжому зразку, взятому щонайменше через 48 годин після забору першого зразка.
- Хибні результати вагітності можуть визначитись при ревматоїдному артриті. В таких випадках констатацію вагітності треба проводити уважно.

Самі результати не повинні бути єдиною причиною для терапевтичних висновків. Результати повинні корелювати з іншими клінічними дослідженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

У лабораторній практиці рекомендується використовувати контролю для кожної каліброваної кривої. Статистичне значення числа контролів повинно бути проаналізоване щоб встановити середні значення і прийнятні діапазони для забезпечення дослідження.

Рекомендується використовувати контролю згідно державним і федеральним правилам.

Використання контролю дає можливість повсякденному оцінці достовірності результатів. Використовуйте контролю і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, зазначені в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також, рекомендується використовувати національні та міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають у встановлені кордони матеріалів контролю, результати є не достовірними.

У такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації та промивання.

Якщо не виявлено помилок, зверніться до Вашого постачальника або безпосередньо до DRG.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться в межах 0.44 - 200 мМО/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність:

Блок	Концентрація	Інтенсивність забарвлення, еквівалентна бета-ХГЛ в сироватці (мМО/мл)
ЛГ	300 мМО/мл	6
ЛГ	200 мМО/мл	< 5
ЛГ	80 мМО/мл	< 5
ТТГ	75 мкМО/мл	8
ТТГ	50 мкМО/мл	< 5
ТТГ	25 мкМО/мл	< 5
ФСГ	200 мМО/мл	< 5
ФСГ	50 мМО/мл	< 5

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість була розрахована на основі середнього значення плюс два стандартних відхилення двадцяти (20) повторних аналізів Стандарту 0 і виявилось, що вона становить 0.44 мМО/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіація в аналізі

Змінюваність в аналізі показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє, мМО/мл	КВ, %
1	20	5.9	9.4
2	20	18.6	4.0
3	20	147.9	3.5

9.4.2 Варіація між аналізами

Змінюваність між аналізами показана нижче:

Зразок	Середнє, мМО/мл	КВ, %
1	5.6	9.9
2	17.1	7.2
3	140.0	6.9

9.5 Відновлення

Зразки були насичені додавання розчинів бета-ХГЛ з відомими концентраціями. Відсоток відновлення обчислювали множенням співвідношення виміряних та очікуваних значень на 100.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (мМО/мл)	30.9	69.0	115.2
Середнє відновлення (%)	94.4	91.3	90.7
Діапазон відновлення (%)	від	91.3	88.6
	до	99.3	94.2

9.6 Лінійність

Зразки вимірювали у нерозведеному вигляді та в серійних розведеннях зі стандартом 0. Відновлення (%) обчислювали множенням співвідношення очікуваних та виміряних значень на 100.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (мМО/мл)	39.7	75.6	128.4
Середнє відновлення (%)	102.0	95.5	96.8
Діапазон відновлення (%)	від	90.9	86.2
	до	115.0	109.3

10 ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу буде виконана з повним розумінням інструкції та з дотриманням належної лабораторної практики. Будь-яка неналежна робота зі зразками чи зміна тесту може впливати на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Не впливають на результати аналізу гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

10.2 Вплив ліків

На сьогодні не виявлено жодних речовин (лікарських засобів), які здійснюють вплив на вимірювання бета-ХГЛ у зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

При тестуванні не було виявлено жодних побічних ефектів аж до 15 800 мМО/мл бета-ХГЛ.

11 ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Тест необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватись правил GLP (належної лабораторної практики) або інших чинних національних стандартів та/або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в процедуру тестування достатню кількість контролів для підтвердження точності та прецизійності тестування.

Результати тесту вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші тестові параметри також відповідають тестовій специфікації.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного тесту навіть якщо всі результати тесту узгоджуються з пунктами, зазначеними в розділі 11.1. Будь-який лабораторний результат - це лише частина загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Надійність

Будь-які зміни тесту чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах тесту. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Виробник не несе відповідальності за будь-які пошкодження набору під час транспортування.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

