

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РАБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11. ЛІТЕРАТУРА	9

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ХОРІОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «ХГ-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «ХГ-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації хоріонічного гонадотропіну в сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Хоріонічний гонадотропін (ХГ) – глікопротеїн, що секретується трофобластичними клітинами плаценти. Молекула ХГ складається з двох нековалентно зв'язаних поліпептидних ланцюгів: α - і β - субодиниці. Специфічність та біологічну активність гормону визначає його β -субодиниця. Концентрацію ХГ в сечі та сироватці крові визначають для ранньої діагностики вагітності. При багатоплідній вагітності рівень ХГ в сироватці значно перевищує відповідні терміну норми. Навпаки, позаматкова вагітність і плацентарна недостатність характеризуються зниженням цього показника. Визначення ХГ в сироватці крові у другому триместрі вагітності (поряд із АФП та естріолом) входить в програму обстеження для виявлення синдрому Дауна. Крім того, ХГ є основним лабораторним діагностичним маркером хоріонепітеліоми та інших трофобластичних пухлин та добре відображає ефективність проведеної протипухлинної терапії. В цій тест-системі в якості антитіла «захоплення» використовується моноклональне антитіло, специфічне для β -субодиниці; прояв антигену, який зв'язав, проводиться за допомогою моноклонального антитіла, специфічного для α -субодиниці; таким чином визначається тільки інтактна молекула ХГ.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення хоріонічного гонадотропіну ґрунтується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла проти бета-субодиниці хоріонічного гонадотропіну людини. У лунках планшета, при додаванні досліджуваного зразка відбувається зв'язування ХГ, який міститься в досліджуваному зразку, з антитілами на твердій фазі.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югата (Fab2) мишачих моноклональних антитіл проти альфа-ланцюга ЛГ/ФСГ/ХГ людини з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації хоріонічного гонадотропіну в досліджуваному зразку. Концентрацію хоріонічного гонадотропіну в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту хоріонічного гонадотропіну в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність.

Перехресна реакція мишачих моноклональних антитіл проти β -субодиниці хоріонічного гонадотропіну людини з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
ЛГ	<0,1
ФСГ	<0,1
ТТГ	<0,1

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту ХГ у тому самому зразку сироватки (плазми) крові із використанням Набору «ХГ-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації ХГ у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить ХГ, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 15–500 МО/л і складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність виміряної концентрації ХГ підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 60 МО/л. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «ХГ-ІФА» концентрація ХГ у сироватці (плазмі) крові не перевищує 1,25 МО/л.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	Кіл-ть	Од.	Опис
1	P205Z	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт.	-
2	C205Z	CAL 1-6	Калібрувальні проби на основі фосфатного буфера (pH 7.2-7.4), що містять відомі кількості хоріонічного гонадотропіну – 0; 15; 60; 125; 250; 500 МО/л , готові до використання (по 0,8 мл кожна)	6	шт.	прозора рідини червоного кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина
3	Q205Z	CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом хоріонічного гонадотропіну, готова до використання (0,8 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
4	T205Z	CONJ HRP	Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідини червоного кольору
5	S011Z4	DIL SPE	ІФА-буфер , готовий до використання (100 мл)	1	шт.	прозора рідини синього кольору
6	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
9	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт.	-
10	K205I	-	Інструкція з використання Набору реагентів «ХГ-ІФА»	1	шт.	-
11	K205Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «ХГ-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потрапленні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09.81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Підготовка планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. В разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 раз (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «ХГ-ІФА» повинен зберігатися в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25°C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

Допускається одноразове заморожування (-20°C) калібрувальних проб та контрольної сироватки в аліквотах.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 41 досліджуваного зразка, 6 калібрувальних проб та 1 проби контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;
- ІФА-Буфер, кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;
- калібрувальні проби та контрольну сироватку після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців; концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, слід зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;
- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб.

Важливе зауваження: після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищені) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Для виключення хибно занижених результатів (т.зв. «хук - ефект») не слід використовувати для дослідження зразки сироватки (плазми) крові вагітних, без їх попереднього розведення ІФА-Буфером. Перелік необхідних факторів розведення, в залежності від терміну вагітності, наведений в п. 9.3. Якщо визначення концентрації ХГ в сироватці (плазмі) проводиться з метою первинної діагностики вагітності (ранні терміни вагітності), зразок необхідно одночасно досліджувати без розведення (цілісна сироватка (плазма)) та з фактором розведення 1:20.

8.8. Не використовуйте компоненти з інших наборів або із аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторах та 14 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Якщо передбачувана концентрація ХГ в досліджуваному зразку, перевищує 500 МО/л, його слід додатково розвести, використовуючи ІФА-Буфер (S011Z4). Використання інших буферів та реагентів для розведення зразків може призвести до помилкових результатів.
3	Обов'язкові розведення досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові залежно від тижня вагітності: 1-2 тиждень - без розведення; 3-4 тиждень - 1:20; 4-14 тиждень - 1:400; 14-21 тиждень - 1:400; 1:1000 22 тиждень, 3-й триместр - 1:400 Приклад розведення досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові: 1:20 – додати 25 мкл зразку в 475 мкл ІФА-Буфера 1:400 – додати 25 мкл розведення 1:20 в 475 мкл ІФА-Буфера 1:1000 – додати 200 мкл розведення 1:400 в 300 мкл ІФА-Буфера
4	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
5	Внесіть у відповідні лунки в двох повторах по 50 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторах по 50 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
6	Обережно перемишайте вміст планшета круговими рухами по горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 60 хвилин при температурі +37°C.
7	По закінченню інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів . При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаліть рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
8	Внесіть в усі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2–3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин, в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
9	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту , при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
10	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірюванн ОГ вмісту лунок планшета необхідно здійснити протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробою С1.
11	Побудуйте у лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація ХГ у калібрувальних пробах (МО/л), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод.
12	Визначте за калібрувальним графіком вміст ХГ у досліджуваних зразках. У разі попереднього розведення досліджуваного зразка (див. п.2), необхідно домножити отриманий результат на фактор розведення.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка. Значення концентрацій ХГ в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (1,25 МО/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (500 МО/л), належить проводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку Х концентрація ХГ нижча за 1,25 МО/л» або «вища за 500 МО/л».

В Наборі «ХГ-ІФА» значення концентрацій калібрувальних проб виражені в МО/л. Для перерахунку концентрацій в нг/мл, отримане значення концентрації в МО/л слід домножити на 0.2.

$$1 \text{ МО/л} = 0.2 \text{ нг/мл}$$

Досліджувана група	Одиниці, МО/л		Одиниці дод., нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
Чоловіки	-	15	-	3.0
Жінки	-	15	-	3.0
Вагітні:				
1 тиждень	-	50	-	10.0
2 тиждень	20	500	4.0	100
3 тиждень	500	5000	100	1000
4 тиждень	3000	19000	600	3800
5-8 тиждень	14000	169000	2800	33800
9-13 тиждень	16000	180000	3200	36000
22 тиждень	4500	70000	900	14000
24 тиждень	3000	69500	600	13900
3-й триместр	2400	50000	480	10000

Медіани та СКВ (рекомендований діапазон норм 0.5-2.0 МОМ)

Вагітні, тижні	Медіана, кМО/л	СКВ
14 тиждень	55	0.83
15 тиждень	42.8	0.78
16 тиждень	38.4	0.74
17 тиждень	32.8	0.75
18 тиждень	25.6	0.69
19 тиждень	23	0.56
20 тиждень	21	0.52
21 тиждень	18	0.51

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Krieg, A.F. Pregnancy Tests and Evaluation of Placental Function. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 16th ed. Henry, J.B. editor, W.B. Saunders Co. Philadelphia. app. 680, 1979.
2. Brody, S., and Carlstrom, G., Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin in Normal and Pathologic Pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 22: 564, 1962.
3. Braunstein, G.D., Rasor, J., Adleer, D., et al: Serum Human Chorionic Gonadotropin Levels Throughout Normal Pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 126: 678, 1976.
4. Skinner, M.S., Seckinger, D., Evaluation of Beta-Subunit Chorionic Gonadotropin as an Aid in Diagnosis of Trophoblastic Disease. Ann. Clin. Lab. Sci., 9 (4): 347-52, 1979.
5. Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J.L., Carbone, P.P., and Ross, G.T., Ectopic Production of Human Chorionic Gonadotropin by Neoplasms. Ann. Intern. Med., 78: 39-45, 1973.

З питань якості Набору **«ХГ-ІФА»**
звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: + 38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ
«ХЕМА» Коваленко Еліна Володимирівна

Для нотаток