

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови (свободная бета-ХГЧ-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови «свободная бета-ХГЧ-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Количественное определение содержания свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина (св.β-ХГЧ) в первом триместре беременности может быть использовано в оценке риска развития у плода трисомии по 21 паре хромосом (синдром Дауна). Исследование концентрации св.β-ХГЧ применяется в диагностике и мониторинге трофобластных заболеваний, определенных тестикулярных и герминогенных опухолей, при которых отмечается повышенное содержание св.β-ХГЧ.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к св. β-ХГЧ. В лунках, при добавлении исследуемого образца, во время первой ин-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ Лабораторией Н.Н. Сорокиной.

кубации происходит связывание св. β -ХГЧ с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител с пероксидазой связывается с св. β -ХГЧ, иммобилизованной в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации св. β -ХГЧ в анализируемых пробах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация св. β -ХГЧ в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к св. β -ХГЧ, готовый для использования – 1 шт.;

- калибровочные образцы, содержащие известные количества св. β -ХГЧ – 0, 10, 25, 50, 100, 200 нг/мл, аттестованные относительно International Ref. Preparation IPR Chorionic Gonadotrophin Beta Subunit, Human NIBSC code: 75/551; концентрации св. β -ХГЧ в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; готовые для использования – 6 флаконов (по 0,3 мл);

- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием св. β -ХГЧ, аттестованный относительно International Ref. Preparation IPR Chorionic Gonadotrophin Beta Subunit, Human NIBSC code: 75/551; готовый для использования – 1 флакон (0,3 мл);

- конъюгат моноклональных антител к св. β -ХГЧ с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);

- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- плёнка для заклеивания планшета – 2 шт.;

- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;

- ванночка для реагента – 2 шт.;

- наконечники для дозатора на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе реагентов моноклональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления св.β-ХГЧ. Не обнаружено перекрестной реакции используемых моноклональных антител с тиреотропным (до 14 мМЕ/л), фолликулостимулирующим (до 86 мМЕ/мл) и лютеинизирующим (до 79 мМЕ/мл) гормонами.

3.2. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в сыворотках крови, содержащих гетерофильные, в том числе антимышинные (НАМА), антитела.

3.3.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации св. β-ХГЧ в контрольном образце, не превышает 8%.

3.4.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации св. β-ХГЧ при разведении калибровочных образцов, содержащих 200, 100, 50 нг/мл св. β-ХГЧ, в 2 раза и калибровочного образца 25 нг/мл св. β-ХГЧ – в 2,5 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.5.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации св. β-ХГЧ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 25 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.6.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация св. β-ХГЧ рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 0,5 нг/мл.

3.7. Клиническая проверка. Концентрация св. β-ХГЧ, измеренная в сыворотке крови 137 условно здоровых мужчин и небеременных женщин в возрасте 18-50 лет, не превышала предела чувствительности метода.

В таблице 1 приведены значения медиан концентраций св. β-ХГЧ, полученные в результате анализа 1281 образца сыворотки крови женщин в I триместре физиологической беременности.

Таблица 1

Срок беременности, недели	Медиана св. β-ХГЧ, нг/мл	Число образцов
8	64,1	16
9	62,8	104
10	56,0	175
11	45,0	309
12	34,0	389
13	29,5	288

3.8. Значения медиан могут отличаться в разных регионах ввиду расовых и популяционных особенностей, поэтому приведенные в таблице значения носят рекомендательный характер и могут быть использованы только на этапе накопления значений собственных медиан в каждой лаборатории.

3.9. Хук-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации св. β -ХГЧ 32000 нг/мл.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Стоп-реагент и раствор тетраметилбензидина плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора тетраметилбензидина плюс на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды. Калибровочные и контрольный образцы содержат натрия мертиолят, проклин 150, фенол. Конъюгат содержит кислоту ортофосфорную, проклин 150.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказываю-

щие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С;
- промывочное устройство для планшетов;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости от 5 до 350 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты и анализируемые образцы сывороток крови при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8 °С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего буферного раствора.

Рабочий буферный раствор приготовить разведением концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольные образцы готовы для использования и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов для использования.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Утилизировать конъюгат, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс (раствора ТМБ плюс).

Раствор ТМБ плюс готов для использования.

Исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или ванночку для реагента.

Утилизировать раствор ТМБ плюс, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Стоп-реагент готов для использования.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

Таблица 2 (расход компонентов)

Количество используемых стрипов	Рабочий буферный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 350	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0

9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 20 мкл каждого калибровочного образца и по 20 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Время внесение образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего буферного раствора (см п. 7.3).

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37 ± 1 °С.

8.4. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл рабочего буферного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37 ± 1 °С.

8.7. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл рабочего буферного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.6) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37 ± 1 °С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.9. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.10. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации св. β -ХГЧ в калибровочных образцах (нг/мл).

9.3. Определить концентрацию св. β -ХГЧ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации св. β -ХГЧ в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона.

9.5. В клинической практике* для оценки риска врожденной патологии плода используется выражение полученных концентраций в МоМ (кратное медианы).

$$\text{МоМ} = \frac{\text{измеренное значение св. } \beta\text{-ХГЧ, нг/мл}}{\text{медиана св. } \beta\text{-ХГЧ, нг/мл}}$$

Значение медиан указано в таблице 1.

* «Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней: Методические рекомендации». Под редакцией члена-корреспондента РАМН, д.м.н., профессора В.С. Баранова и академика РАМН, заслуженного деятеля науки РФ, д.м.н., профессора Э.К. Айламазяна — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009.

9.6. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации св. β -ХГЧ в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

9.7. Для представления результатов измерения концентрации св. β -ХГЧ в мМЕ/мл, следует использовать коэффициент пересчёта 1,0 ($1 \text{ мМЕ/мл} = 1 \text{ нг/мл}$).

Примечание: Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 46,8 г/л; билирубин в концентрации до 141,3 мг/л и триглицериды в концентрации до 100,1 г/л пригодны для использования.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные и контрольный образцы, конъюгат, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- рабочий буферный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации св. β -ХГЧ в контрольном образце.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 11 листов.
Ректор ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
д.м.н., профессор

В.М. Попков

“ 12 2017 г. ”

