

УТВЕРЖДЕНА

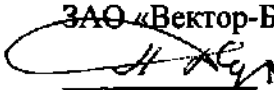
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

2010 г.



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 «свободная бета-ХГЧ – ИФА – БЕСТ» предназначен для определения концентрации свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина (св.β-ХГЧ) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ХГЧ представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 36,7 кДа, состоящий из α- и β- субъединиц. α-цепь является общей для ХГЧ и трех других гликопротеиновых гормонов гипофиза: тиреотропного, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего. β-субъединица с молекулярной массой 23 кДа обладает специфической активностью и антигенными свойствами. Концентрация св.β-ХГЧ составляет не более 0,5-1% от интактной молекулы ХГЧ.

ХГЧ является одним из важнейших маркеров беременности и ее патологии, а также одним из опухолевых маркеров.

1.3. Количественное определение содержания св.β-ХГЧ в сыворотке крови может быть использовано для ранней пренатальной диагностики врожденной патологии плода в I-ом триместре беременности. Данный тест позволяет уже на сроках с 10 по 14 неделю оценить риск развития у плода трисомий, в первую очередь синдрома Дауна (трисомия по 21 паре хромосом). Концентрация св.β-ХГЧ в сыворотке крови при синдроме Дауна значительно выше нормальных значений.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД О.С. Вороновой.

Обычно рекомендуется проведение этого исследования в составе так называемого «двойного теста» I триместра, который включает в себя два биохимических маркера: св.β-ХГЧ и плазменный белок А, ассоциированный с беременностью (РАРР-А). Такая комбинация значительно повышает вероятность раннего выявления хромосомной патологии.

Исследование концентрации свободной β-субъединицы ХГЧ применяется в диагностике и мониторинге трофобластных заболеваний и определенных тестикулярных опухолей, при которых отмечается повышенное содержание св.β-ХГЧ. В некоторых случаях подобные опухоли могут секретировать только свободную β-субъединицу.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов и 1 пробы 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 к св.β-ХГЧ. В лунках, при добавлении исследуемого образца, во время первой инкубации 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) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к св.β-ХГЧ, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно Первого международного стандарта ХГЧ 1th (IRP 75/551), содержащие известные количества св.β-ХГЧ – 0; 10; 25; 50; 100 и 200 нг/мл; 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 сыворотки крови человека с известным содержанием св.β-ХГЧ, готовый для использования – 1 флакон (0,3 мл);
- конъюгат моноклональных антител к св.β-ХГЧ с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,3 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 3 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночками для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе реагентов моноклональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления св.β-ХГЧ.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания св.β-ХГЧ в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «свободная β-ХГЧ – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации св.β-ХГЧ при разведении анализируемых проб сывороткой крови, не содержащей св.β-ХГЧ, не превышает 10% в диапазоне концентраций 10 – 200 нг/мл.

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

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация св.β-ХГЧ не превышает 1 нг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Исследование сывороток крови здоровых мужчин и небеременных женщин с использованием набора реагентов «свободная бета-ХГЧ – ИФА – БЕСТ» показало, что концентрация св.β-ХГЧ не превышала предел чувствительности метода.

В таблице 1 приведены значения медиан концентраций св.β-ХГЧ, полученные в результате анализа сывороток крови женщин Новосибирской области в I триместре физиологической беременности.

Таблица 1

Срок беременности, недели	Медиана св.β-ХГЧ, нг/мл
10	76,8
11	62
12	42,23
13	36,35
14	26,91

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации св.β-ХГЧ. 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 собственных медиан в каждой лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, 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 по-

мещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов 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 при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 10 до 5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости от 20 до 300 мкл;

– промывочное устройство для планшетов;

– флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 500 мл;

– колбы вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 5 сут или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18-25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18-25 °С в течение времени не менее 30 мин.

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, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

7.4. Приготовление рабочего буферного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий буферный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 сут.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата конъюгата и рабочего буферного раствора за 5-10 мин до окончания первой инкубации. Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18-25 °С.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата тетраметилбензидина и субстратного буферного раствора за 5-10 мин до окончания второй инкубации. Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18-25 °С в защищенном от света месте.

В таблице 2 приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица 2

Кол-во используемых стрипов	Рабочий буферный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, мл	Вода дистиллированная, мл	Конъюгат, концентрат, мл	Рабочий буферный раствор, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мл	Субстратный буферный раствор, мл
2	4,0	до 100	0,2	2,0	0,14	2,0
3	6,0	до 150	0,3	3,0	0,21	3,0
4	8,0	до 200	0,4	4,0	0,28	4,0
5	10,0	до 250	0,5	5,0	0,35	5,0
6	12,0	до 300	0,6	6,0	0,42	6,0
7	14,0	до 350	0,7	7,0	0,49	7,0
8	16,0	до 400	0,8	8,0	0,56	8,0
9	18,0	до 450	0,9	9,0	0,63	9,0
10	20,0	до 500	1,0	10,0	0,70	10,0
11	22,0	до 550	1,1	11,0	0,77	11,0
12	24,0	до 600	1,2	12,0	0,84	12,0

7.7. Внести в соответствующие лунки в дублях по 20 мкл каждого калибровочного образца и по 20 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки.

Внесение образцов необходимо проводить быстро, в течение 10–15 минут.

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего буферного раствора (см п. 7.4).

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 650 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (п. 7.4). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.5). Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 650 об/мин.

7.13. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.10.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6), заклеить стрипы пленкой и инкубировать в течение 15 мин в темноте при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 650 об/мин.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре 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 (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

9.2. Определить содержание св.β-ХГЧ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

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

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре 2-8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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

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

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 18–25 °С не более 3 ч;

- рабочий буферный раствор можно хранить при температуре 2–8 °С не более 5 сут;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре 18–25 °С не более 3 ч.

10.4. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-

Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «свободная бета-ХГЧ – ИФА – БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

Ст. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 О.С. Воронова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Ю. Рукавишников

Первый проректор, и.о. ректора
СГМУ им. В.И. Разумовского
Росздрава, доцент
М.П.

 В.М. Попков



Принято
принято
есть (10) листов

И. Сергеева Е.А.