

**УТВЕРЖДЕНА**

Приказом Росздравнадзора

от 10 декабря 2007 г. № 4625-ПР/07

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2007 г.

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения  
концентрации трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина в сыворотке крови  
**(ТБГ-ИФА-БЕСТ)**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

1.1. Набор реагентов ТБГ-ИФА-БЕСТ предназначен для определения концентрации трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Трофобластический  $\beta$ -1-гликопротеин (ТБГ) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 75 кДа. ТБГ является специфическим маркером беременности. Синтез ТБГ осуществляется клетками трофобласта, из которых он секретируется в кровоток матери. В сыворотке крови беременных ТБГ определяется на 3-4-й неделе беременности, в дальнейшем его концентрация прогрессивно возрастает в течение гестационного процесса и достигает максимального уровня к 35-38-й неделе беременности. За 6-7 дней до спонтанных родов наблюдается снижение уровня ТБГ. Одним из важнейших физиологических эффектов ТБГ является его иммуносупрессивное действие, что необходимо для нормального развития беременности.

1.3. Количественное определение содержания ТБГ в сыворотке крови может быть использовано для диагностики беременности, мониторинга беременности с целью оценки функции трофобласта, выявления внематочной беременности, угрожающего выкидыша и другой патологии беременности, а также контроля проводимой терапии.

---

*Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ведущим научным сотрудником НИИ СД Н.Н. Сорокиной, научным консультантом Э.А. Юркиной.*

ТБГ относится к группе онкофетальных белков и является специфическим индикатором развития трофобластической болезни и хорионэпителиомы матки. В онкологической практике определение ТБГ может быть использовано для диагностики злокачественной патологии трофобласта и оценки эффективности хирургического лечения или химиотерапии, раннего выявления рецидивов.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

## **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

### **2.1. Принцип метода**

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит связывание ТБГ с поликлональными антителами к ТБГ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и поликлональными антителами к ТБГ, конъюгированными с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ТБГ в анализируемых пробах.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ТБГ в анализируемых образцах.

### **2.2. Состав набора**

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности поликлональными антителами к ТБГ человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ТБГ – 0; 10; 25; 50; 100; 200 нг/мл; концентрации ТБГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,5 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ТБГ, готовая для использования – 1 флакон (0,5 мл);
- конъюгат поликлональных антител к ТБГ с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (0,7 мл);
- раствор для разведения сывороток – 3 флакона (по 12 мл);

- промывочный раствор, концентрат – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения тетраметилбензидина – 1 флакон (12 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (1 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 1 шт;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт;
- ванночка для реагента – 2 шт;
- наконечники для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

### **3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

3.1. Специфичность. Используемые в наборе поликлональные антитела обеспечивают специфическое взаимодействие с ТБГ. Не обнаружено перекрестной реакции с РЭА.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ТБГ-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ТБГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10-200 нг/мл и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ТБГ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТБГ не превышает 1,5 нг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 115 у здоровых небеременных женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет. Концентрация ТБГ не превышала 10 нг/мл. В табл. 1 приведены значения ожидаемых концентраций ТБГ у женщин на различных сроках нормально протекающей беременности и соответствующие им рекомендуемые разведения сыворотки перед проведением анализа.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

#### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты 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 инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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.

#### **5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ**

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре  $+37 \pm 1$  °C и 600-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5, 10, 20, 50, 100 и 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 50, 100 и 250 мкл;

- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 30 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2–8°C не более 24 ч 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 комнатной температуре (+18-25 °C).

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре 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 °C в течение всего срока годности.

### **7.3. Приготовление рабочего разведения анализируемых образцов сыворотки крови**

Готовится в стеклянных заранее промаркированных флаконах за 5-10 мин до начала постановки анализа.

7.3.1. Сыворотки крови развести раствором для разведения сывороток в соответствии с рекомендуемыми разведениями для данного срока беременности (см табл. 1). Например: 10 мкл исследуемого образца + 90 мкл раствора для разведения сывороток (раствор А) – разведение в 10 раз; 10 мкл раствора А + 90 мкл раствора для разведения сывороток (раствор Б) – разведение в 100 раз и т.д.

Использовать в течение 30 мин после приготовления.

7.3.2. Сыворотки крови больных онкологическими заболеваниями развести раствором для разведения сывороток в 10 раз.

Использовать в течение 30 мин после приготовления.

Таблица 1

| Срок беременности<br>в неделях | Концентрация<br>ТБГ в сыворотке<br>крови (нг/мл) | Рабочее<br>разведение<br>сывороток |
|--------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| 4-6                            | 350-5000                                         | 1:10-1:100                         |
| 6-8                            | 4000-17000                                       | 1:100                              |
| 9-10                           | 8000-24000                                       | 1:100-1:1000                       |
| 11-12                          | 14000-35000                                      | 1:100-1:1000                       |
| 13-14                          | 18000-45000                                      | 1:100-1:1000                       |
| 15-16                          | 24000-65000                                      | 1:1000                             |
| 17-18                          | 26000-80000                                      | 1:1000                             |
| 19-20                          | 30000-85000                                      | 1:1000                             |
| 21-22                          | 35000-95000                                      | 1:1000                             |
| 23-24                          | 40000-100000                                     | 1:1000                             |
| 25-26                          | 55000-160000                                     | 1:1000                             |
| 27-28                          | 80000-200000                                     | 1:1000                             |
| 29-30                          | 95000-250000                                     | 1:1000-1:10000                     |
| 31-34                          | 120000-350000                                    | 1:1000-1:10000                     |
| 35-40                          | 150000-400000                                    | 1:1000-1:10000                     |

#### 7.4. Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора перенести в колбу вместимостью 1000 мл, добавить 672 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30-40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2-8 °С не более 3 сут.

#### 7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до проведения анализа. Использовать в течение 1 ч после приготовления.

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

#### 7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания инкубации!

Использовать в течение 3 ч после приготовления; хранить в защищенном от света месте.

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

Таблица 2

| Количество используемых стрипов | Рабочий раствор конъюгата |                                 | Рабочий раствор тетраметилбензидина |                                                |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                 | Конъюгат, концентрат, мл  | Рабочий промывочный раствор, мл | Тетраметилбензидин, концентрат, мл  | Раствор для разведения тетраметилбензидина, мл |
| 2                               | 0,10                      | 4,0                             | 0,14                                | 2,0                                            |
| 3                               | 0,15                      | 6,0                             | 0,21                                | 3,0                                            |
| 4                               | 0,20                      | 8,0                             | 0,28                                | 4,0                                            |
| 5                               | 0,25                      | 10,0                            | 0,35                                | 5,0                                            |
| 6                               | 0,30                      | 12,0                            | 0,42                                | 6,0                                            |
| 7                               | 0,35                      | 14,0                            | 0,49                                | 7,0                                            |
| 8                               | 0,40                      | 16,0                            | 0,56                                | 8,0                                            |
| 9                               | 0,45                      | 18,0                            | 0,63                                | 9,0                                            |
| 10                              | 0,50                      | 20,0                            | 0,70                                | 10,0                                           |
| 11                              | 0,55                      | 22,0                            | 0,77                                | 11,0                                           |
| 12                              | 0,60                      | 24,0                            | 0,84                                | 12,0                                           |

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл каждой калибровочной пробы и по 20 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в соответствующем рабочем разведении.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

7.8. Внести во все лунки по 200 мкл рабочего раствора конъюгата (см. п. 7.4)

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре  $+37 \pm 1$  °C и 700 об/мин.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 250 мкл рабочего промывочного раствора (см. п. 7.3), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После промывки следует тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина и инкубировать в темноте в течение 10–15 мин (в зависимости от степени развития окрашивания) при комнатной температуре (+18-25 °С).

7.12. 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 - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

## **9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации ТБГ в калибровочных пробах (нг/мл).

9.2. Определить содержание ТБГ в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику. Полученную концентрацию ТБГ умножить на фактор разведения.

## **10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

10.1. Набор реагентов ТБГ-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (6 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах 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;

– калибровочные пробы, контрольную сыворотку, раствор для разведения сывороток, концентраты конъюгата и тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2-8 °С не более 1 мес;

– раствор для разведения тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;

– рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре ( $+18-25^{\circ}\text{C}$ ) не более 1 ч;

– рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  не более 3 сут;

– рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре ( $+18-25^{\circ}\text{C}$ ) не более 3 ч;

– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ТБГ в контрольной сыворотке.

10.3. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора ТБГ-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 **Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора** по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.6

Ведущий научный сотрудник НИИ СД  
ЗАО «Вектор-Бест»

 Н.Н. Сорокина

/ Директор Клинического центра  
ММА им. И.М. Сеченова

 П.Н. Морозов

Генеральный директор  
ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

