



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

11 ноября 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения

плацентарного лактогена в сыворотке (плазме) крови

«PL-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «PL-ИФА» предназначен для *in vitro* определения плацентарного лактогена в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Плацентарный лактоген (хориомаммотропин, хорионический соматомаммотропин, хорионический лактосоматотропный гормон) синтезируется синцитиотрофобластом с ранних сроков беременности и затем прогрессирующе растет при физиологически протекающей беременности. ПЛ начинает определяться в крови женщины с 5-6-й недель беременности. Его уровень зависит от массы плода, массы и числа плацент (при многоплодии). Максимальный уровень ПЛ отмечается в 36-37 нед., до 39-ти нед. его концентрация остается практически неизменной. С 40-41-й нед. происходит снижение уровня ПЛ в связи с начинающимся в этот период уменьшением плацентарного кровообращения и «старением» плаценты. После рождения ребёнка ПЛ быстро исчезает из крови матери. ПЛ регулирует метаболические процессы в организме беременной, направленные на обеспечение роста и развития плода. ПЛ обладает лактотропной, соматотропной и лютеотропной активностью, ингибирует клеточный иммунитет матери, способствует потреблению глюкозы в организме плода, снижает синтез белка у беременной, увеличивая запас аминокислот, используемых плодом при своем формировании.

Высокая информативность ПЛ как прямого показателя функционирования плаценты объясняется коротким периодом полураспада, отсутствием циркадного ритма секреции и наличием единственного источника синтеза. Динамика уровня ПЛ в крови матери позволяет контролировать состояние плаценты и плода на протяжении всей беременности, что дает возможность своевременно диагностировать фетоплацентарную недостаточность и определить дальнейший план ведения беременности и способ родоразрешения.

Повышен: многоплодная, резус-конфликтная беременность; опухоли трофобласта; у беременных женщин с СД и с почечной патологией.

Снижен: пузырный занос (при беременности более 8-ми нед.), поздний токсикоз беременности, внутриутробная гипотрофия и хроническая гипоксия плода; у женщин с артериальной гипертензией. Крайне низкие значения уровня ПЛ определяются накануне

внутриутробной гибели плода и за 1-2 дня до самопроизвольного выкидыша. При антенатальной гибели плода отмечается снижение концентрации ПЛ на 80% и более: в этом случае концентрация ПЛ снижается значительно раньше, чем регистрируется прекращение сердцебиения плода.

1.4. Диагностическая значимость определения.

Определение уровня плацентарного лактогена в сыворотке (плазме) крови используется для:

1. Оценки состояния плаценты и мониторингирования беременности (хроническая гипертензия, поздние сроки осложненных беременностей), в комплексе с определением свободного эстриола;
2. Диагностики трофобластных заболеваний - пузырного заноса и хорионкарциномы.

1.5. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение плацентарного лактогена основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к антигену ПЛ. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации одновременно происходит связывание плацентарного лактогена, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к плацентарному лактогену с пероксидазой.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание содержимого лунок. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации плацентарного лактогена в исследуемом образце. Концентрацию плацентарного лактогена в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (OP_{450}) от содержания плацентарного лактогена в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества плацентарного лактогена – 0; 1,5; 5; 10 и 30 мг/л; концентрации ПЛ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (калибровочная проба 0 мг/л – 6 мл, остальные по 0,8 мл каждая);
- **конъюгат**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **ИФА-Буфер**, готов к использованию – 1 флакон (50 мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);



- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ПЛ; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- **аналитический паспорт**;
- **Инструкция по применению Набора.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Использование подобранной на испытательной базе ООО «ХЕМА» пары мышиных моноклональных антител к плацентарному лактогену человека позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «PL-ИФА» концентрация плацентарного лактогена в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,1 мг/л.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания плацентарного лактогена в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «PL-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» плацентарного лактогена - соответствие измеренной концентрации плацентарного лактогена предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5,0 мг/л.

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации плацентарного лактогена в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей плацентарного лактогена, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1,5-30 мг/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

В соответствии с требованиями GLP (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «PL-ИФА» уточнить значения концентрации плацентарного лактогена, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

Исследуемая группа	Единицы, мг/л			
	Беременные (одноплодная беременность)		Беременные (многоплодная беременность)	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
10-12	0,05	1,0	-	-

12-14	0,1	1,7	-	-
14-16	0,3	2,8	-	-
16-18	0,5	3,5	-	-
18-20	0,9	4,0	-	-
20-22	1,1	5,0	2,2	7,0
22-24	1,3	5,8	3,0	8,1
24-26	1,6	6,7	3,6	9,2
26-28	2,0	7,7	4,1	10,3
28-30	2,7	8,5	4,6	11,7
30-32	3,2	9,5	5,0	13,0
32-34	3,7	10,1	5,4	15,1
34-36	4,0	10,7	5,7	17,8
36-38	4,3	11,2	5,9	19,7
38-40	4,4	11,7	5,8	19,6
40-42	4,3	11,6	0,0	0,0

3.7. Интерференция.

Изучение образцов плазмы с различными антикоагулянтами показало, что такие антикоагулянты как ЭДТА, гепарин и цитрат натрия не приводят к матричному эффекту.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора по ГОСТ 31508–2012 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» и Номенклатурной классификации медицинских изделий, утв. Приказом Минздрава Российской Федерации от № 4н от 6 июня 2012 года (в ред. Приказа Минздрава России от 25.09.2014 N 557н) – класс 2б.

4.2. Набор предназначен только для профессионального использования.

4.3. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении калибраторов и контрольной сыворотки, инактивированы и не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ 1, 2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1.

4.4. При работе с Набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток), так как образцы сыворотки или плазмы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.

4.5. Все промывные растворы следует собирать в специальный контейнер и обрабатывать дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке.

4.6. Необходимо избегать контакта субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ), концентрата отмывочного раствора и Стоп-реагента с кожей и слизистыми.

4.7. Лабораторную посуду многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.

4.8. Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70% раствором этилового спирта.

4.9. Медицинские отходы класса Б. Утилизацию или уничтожение наборов реагентов следует проводить 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».

4.10. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Сбор образцов крови человека проводить в соответствии с текущей практикой методом венопункции. Для анализа использовать неразведённую сыворотку (плазму) крови человека. Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка.

6.2. Образцы сыворотки или плазмы крови хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток. Предпочтительно исследование образцов, хранящихся не более 24 часов при температуре 2-8°C.

6.3. Допустимо замораживание образцов для более длительного хранения (до температуры -20°C и ниже) не более 2 недель. Допускается однократное размораживание\замораживание образцов.

6.4. Перед проведением исследования образца, подвергнутого замораживанию, его следует тщательно перемешать и осветлить с помощью центрифугирования.

6.5. Образцы сыворотки (плазмы), содержащие агрегаты и осадок, осветлять с помощью центрифугирования.

6.6. Образцы с гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом исследованию не подлежат, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.6. Перед проведением анализа исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

6.7. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

6.8. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрата + 19 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 101 раз, используя ИФА-Буфер.

7.2. Если предполагаемая концентрация плацентарного лактогена в исследуемом образце превышает 30 мг/л, его следует развести используя калибровочную пробу 0 мг/л.

7.3. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

7.4. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.5. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$.

7.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета

круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.7. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.8. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реактанта; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реактанта в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реактанта.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация ПЛ в калибровочных пробах (мг/л), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание ПЛ в исследуемых образцах.

9.3. Если исследуемый образец сыворотки (плазмы) дополнительно разводили (см. п. 7.1.), умножить полученный результат на фактор разведения.

10. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

10.1. При использовании Набора реагентов «PL-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение свободного тестостерона в контрольной сыворотке.

10.2. Набор реагентов «PL-ИФА» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента.

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

11.1. Транспортирование Набора реагентов «PL-ИФА» должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре $(+2-8)^{\circ}\text{C}$.

Не допускается замораживание целого Набора.

11.2. Набор реагентов «PL-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 15 сут.

11.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

11.4. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20°C в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 5 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 сут;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

11.5. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- Не использовать Набор реагентов, если упаковка повреждена.
- Тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа.
- Использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду,

обработанную дистиллированной водой.

- Использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку.
- Исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшеты во время проведения исследования.

- Не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении иммуноферментного анализа.

11.6. Все компоненты Набора реагентов «PL-ИФА» при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Не используйте Набор с истекшим сроком годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

11.7. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры постановки анализа могут повлиять на результаты. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «PL-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Заместитель генерального директора
по технологии ООО «ХЕМА»  Кострикина Е.С.
06 декабря 2016 г. М.П.

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»  Варнавичус П.К.
«21»  2016 г.
М.П.



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 9 ЛИСТОВ

«21» 12 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

