

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»



О. Н. Шлюндин
2014 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГЧ»**

**Тест-система иммуноферментная для количественного
определения свободной Бета-субъединицы
хорионического гонадотропина**

Введена впервые



I. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
II. ПРИНЦИП ТЕСТА	3
III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГч».....	4
IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ	7
VII. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ.....	7
VIII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ.....	7
IX. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	8
X. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ	8
XI. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	9
XII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ	10
XIII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА.....	10
XIV. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	11
XV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ	11
XVI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Приложение 1	12
Приложение 2	13
Приложение 3	14

I. НАЗНАЧЕНИЕ

1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГч» предназначен для количественного определения концентрации свободной β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГч) в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

2. ХГч – гликопротеиновый гормон с молекулярной массой около 40000 Да, секретируемый трофобластическими клетками плаценты и некоторыми опухолями. ХГч состоит из двух субъединиц – альфа (сходной у всех гормонов передней доли гипофиза) и бета, определяющей биологическую активность гормона.

Количественное определение уровня свободной β -ХГч в сыворотке крови беременных женщин является важным методом пренатальной диагностики некоторых врожденных заболеваний. Содержание в крови и моче свободной β -субъединицы изменяется при хромосомной аномалии плода (трисомия по 21 хромосоме - синдром Дауна, синдром Эдвардса - трисомия по 18 паре хромосом и синдром Патау - трисомия по 13 паре хромосом). При наличии хромосомных aberrаций у плода содержание свободной β -субъединицы ХГч повышается быстрее, чем концентрация общего ХГч, поэтому определение β -субъединицы ХГч предпочтительнее для пренатального скрининга патологии плода в I триместре беременности (оптимально на сроке 9–11 недель).

Свободная β -ХГч также продуцируется опухолевыми клетками различного происхождения. Исследование концентрации свободной β -субъединицы ХГч применяется в диагностике и мониторинге трофобластных заболеваний и определенных тестикулярных опухолей, при которых отмечается повышенное содержание субъединицы ХГч. Этот маркер используется для диагностики злокачественных новообразований, как у женщин (хориокарцинома), так и мужчин (опухоли яичка).

3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех стандартных калибровочных проб.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

В наборе «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГч» применен «сэндвич»-вариант двухстадийного твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум доменам свободной субъединицы β -ХГч: первые антитела иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченые пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках планшета во время первой инкубации происходит связывание содержащейся в исследуемом образце свободной субъединицы β -ХГч с антителами, иммобилизованными на твердой фазе. Во время второй инкубации антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, связываются со свободной субъединицей β -ХГч, иммобилизованной в ходе первой инкубации. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству свободной субъединицы β -ХГч в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации свободной субъединицы β -ХГч в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободной субъединицы β -ХГч в определяемых образцах.

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к свободной β -ХГЧ.	1 шт.
Конъюгат - моноклональные антитела к свободной β -ХГЧ, меченые пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,008% гентамицина сульфата, 0,1% фенола.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы, аттестованные по Международному стандарту WHO IRP 75/551, содержащие известные количества свободной β -ХГЧ. Прозрачные или опалесцирующие желтого цвета жидкости. Значения концентраций β -ХГЧ указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1% проклин 300, 0,008% гентамицина сульфата, 0,1% фенола.	6 флаконов (5 флаконов по 0,5 мл, Калибратор 0 – 2,0 мл)
Контрольная сыворотка - образец с известным содержанием свободной β -ХГЧ. Прозрачная или опалесцирующая желтого цвета жидкость. Значение концентрации свободной β -ХГЧ в контрольной сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,008% гентамицина сульфата, 0,1% фенола.	1 флакон 0,5 мл
БР - блок-раствор для рабочего разведения сывороток и калибровочных проб. Прозрачная или опалесцирующая голубого цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,008% гентамицина сульфата.	1 флакон 12,0 мл
ПР (концентрат x 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор – прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл
Стоп-реагент/0,2М – серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетах или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт. 2 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock	1 шт.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая концентрация свободной β -ХГЧ в сыворотке крови человека не превышает 2,0 нг/мл.

2. Специфичность. Для определения кросс-реактивности в образец сыворотки с известной концентрацией свободной β -ХГЧ добавляли кросс-реагенты, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Специфичность тест-системы «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГЧ»

Реагент	Кросс-реактивность, %
Свободная субъединица β -ХГЧ	100%
ГГГ	0,24%
ЛГ	0,002%
ФСГ	0,033%
Пролактин	0,472%
ХГЧ	0,005%

3. Коэффициент вариации результатов определения свободной β -ХГЧ в одном и том же образце с использованием набора «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГЧ» не превышает 8%.

4. Линейность. Зависимость концентрации свободной β -ХГЧ в образцах сыворотки крови при разведении их «Калибратором 0» имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации свободной β -ХГЧ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №2. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

6. При использовании набора «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГЧ» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации свободной β -ХГЧ 35000 нг/мл.

7. Клиническая проверка. Концентрацию свободной β -ХГЧ измеряли в образцах сыворотки крови взятой у 101 здорового донора в возрасте от 20 до 40 лет. Концентрация свободной β -ХГЧ не превышала 2,0 нг/мл.

8. В таблице 3 приведены медианы недели, полученные на основе анализа 5878 образцов сывороток крови от женщин Нижегородской области в I триместре физиологической беременности.

Таблица 3

Медианы недели

Срок беременности, недели	Число образцов	Медиана недели, нг/мл	0,5-0,95 перцентиль
9	260	61,6	17,5-185,6
10	566	58,8	15,1-253,2
11	1945	49,7	12,6-172,7
12	2328	44,0	12,0-175,6
13	779	36,4	8,0-143,3

Установлена обратно пропорциональная зависимость между содержанием свободной β -ХГЧ в сыворотке крови и весом беременной женщины. Медианы, рассчитанные в зависимости от веса беременных женщин, представлены в таблице 4.

Медианы в зависимости от веса беременных

Срок беременности, недели	Число образцов	Медиана (нг/мл) 45 кг	Число образцов	Медиана (нг/мл) 60 кг	Число образцов	Медиана (нг/мл) 75 кг	Число образцов	Медиана (нг/мл) 90 кг
9	41	75,3	121	67,6	65	57,4	27	34,2
10	76	69,4	292	58,8	149	48,8	64	41,2
11	329	58,8	596	50,4	435	44,7	162	37,8
12	406	54,6	1290	45,0	524	37,4	188	29,7
13	123	43,0	434	36,4	189	30,2	52	25,2

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ХГЧ, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

Проведено сравнение набора «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГЧ» с иммуноферментным тестом «Гонадотропин ИФА-свободная бета-ХГЧ», ООО «Алкор Био», Россия. Высокая степень корреляции позволяет использовать программный комплекс пренатального скрининга для расчета риска синдрома Дауна «Исида» («Алкор Био», Россия) для анализа результатов, получаемых с помощью набора «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГЧ».

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.)

5.2. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифических компонентов (ПР (концентрат х 25), ТМБ-Субстратный раствор, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».
- Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгата.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.
- Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок – важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Необходимо использовать воду дистиллированную или деионизированную.

Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики “in vitro”.
- При работе с исследуемыми образцами нужно обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы, пробы и реагенты, любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128°C под давлением 1,5 кг/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или другого хлорсодержащего средства. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



- **xi** Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% – раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

VII. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ-287-113).

VIII. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- Термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре (37,0 ± 1,0) °C;
- Инкубатор микропланшетный (37,0 ± 1,0) °C
- Устройство для промывания планшетов (вошер);

Дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5-50 мкл, на 40-200 мкл, на 200-1000 мкл, на 1000-5000 мкл с наконечниками;

- Дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- Цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- Вода дистиллированная или деионизированная;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Перчатки резиновые или пластиковые.

IX. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником!** Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6-ти суток. Более длительное хранение (до 3 мес.) допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

X. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут! Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. После вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.
- **Конъюгат.**
- **Стандартные калибровочные пробы.**
- **Контрольная сыворотка.**
- **БР – блок-раствор** для рабочего разведения сывороток и калибровочных проб.
- **ТМБ-Субстратный раствор.**
- **Стоп-реагент.**

2. Приготовление рабочих растворов.

- **Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной или деионизированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут при температуре от 18 до 24 °С или 28 сут при температуре от 2 до 8 °С.

3. Хранение неиспользованных реагентов.

После вскрытия флаконов оставшиеся неиспользованными реагенты набора: конъюгат, стандартные калибровочные пробы, контрольная сыворотка, БР, ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении 2 месяцев при

температуре от 2 до 8 °С. Оставшиеся неиспользованными ПР (концентрат х 25), стоп-реагент хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

XI. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 24 °С.

1. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 20 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести по 20 мкл исследуемых образцов сывороток крови в дубликатах.

2. Во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл БР. Перемешать содержимое лунок осторожным постукиванием по краю планшета в течение 30 сек.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 мин!

3. Возможны три процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, $(37,0 \pm 1,0)$ °С):

Планшет инкубировать 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С.

Процедура 2 (термостат, $(37,0 \pm 1,0)$ °С):

Планшет инкубировать в течение 30 минут во влажной камере в термостате при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С.

Для создания влажной камеры планшет закрыть крышкой, на которую положить смоченную водой фильтровальную бумагу, планшет поместить в полиэтиленовый пакет, после чего края пакета завернуть вниз.

Процедура 3 (комнатная температура):

Планшет закрыть крышкой или защитной плёнкой. Планшет инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °С).

4. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в емкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 3 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в емкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

5. Во все лунки отмытого планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата.

6. В зависимости от используемой процедуры инкубировать планшет:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, $(37,0 \pm 1,0)$ °С):

Планшет инкубировать 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С.

Процедура 2 (термостат, $(37,0 \pm 1,0)$ °С):

Планшет инкубировать в течение 60 минут во влажной камере в термостате при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С.

Процедура 3 (комнатная температура):

Планшет закрыть крышкой или защитной плёнкой. Планшет инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °С).

7. Содержимое лунок удалить в емкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 5 раз, как в п. 4.

8. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 20-30 мин.

Процедура 2: 20-30 мин.

Процедура 3: 20-30 мин.

9. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 3.

10. Спектрофотометрический контроль внесения реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-Гонадотропин-свободная Бета-субъединица ХГч» на автоматических ИФА-анализаторах.

Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,300.

ХII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов провести спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

Реакцию следует учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора – не более 0,1.

На бланке для построения калибровочной кривой в линейных координатах по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации свободной субъединицы β -ХГч, выраженной в нг/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Для исследуемых образцов определяют концентрацию свободной субъединицы β -ХГч по калибровочному графику. Для этого на оси ординат Y отмечают значение ОП исследуемого образца, проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки проводят перпендикуляр до оси абсцисс X. Точка пересечения покажет значение концентрации свободной субъединицы β -ХГч в исследуемом образце, выраженную в нг/мл.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций свободной субъединицы β -ХГч в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации свободной субъединицы β -ХГч в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

Для образца с ОП выше, чем в калибровочной пробе №5, выдаётся результат: больше номинации «Калибратора 5» или этот образец следует развести калибровочной пробой №0, анализ повторить. В случае разведения образца необходимо измеренную концентрацию свободной субъединицы β -ХГч умножить на фактор разведения.

ХIII. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

1. Все реагенты набора предназначены для определения свободной субъединицы β -ХГч в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения свободной субъединицы β -ХГч в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

2. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры теста могут повлиять на результаты.

3. Для разведения образцов сывороток с высоким содержанием свободной субъединицы β -ХГч следует использовать «Калибратор 0». Применение других реагентов может привести к ложным результатам.

4. Наличие гетерофильных антител у пациентов, имеющих дело с животными или получавших моноклональные антитела в качестве лечения, может оказывать влияние на результаты иммунологических тестов.

5. Набор не предназначен для тестирования образцов сывороток крови новорожденных.

6. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с результатами исследования другими методами.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

Хранение – в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Транспортирование – при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование от 9 до 20 °С и не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

XV. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности число/месяц/год
	Использовать инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество
Code: X.X.XX	Идентификационный код

XVI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. Приложение 1 к данной инструкции.

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России
д.м.н, профессор .

В. В. Долгов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spencer K, Bindra R, Nicolaides KH. Maternal weight correction of maternal serum PAPP-A and free beta-hCG MoM when screening for trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 2003 Oct; 23(10):851-5.
2. Hallahan T., Krantz D., Orlandi F.. First trimester biochemical screening for Down syndrome: free beta hCG versus intact hCG *PRENATAL DIAGNOSIS*, *Prenat. Diagn.* 2000; 20: 785-789.
3. Bruckner T. A., Pearl M., Currier R., Kharrazi M. A test of maternal human chorionic gonadotropin during pregnancy as an adaptive filter of human gestations. *Proc. R. Soc. B* 22, 2012 vol. 279 no. 1747 4604-4610.
4. Spencer K, Cowans NJ, Avgidou K, Nicolaides KH. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of impending fetal death. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 28(5):637-43, 2006.
5. Sillence K. A., Madgett T. E., Roberts L. A., Overton T. G. and Avent N. D., Non-Invasive Screening Tools for Down's Syndrome: A Review *Diagnostics* 2013, 3, 291-314.
6. Yaron Y, Mashiach R. First-trimester biochemical screening for Down syndrome. *Clin Perinatol.* 28(2):321-31, 2001.
7. Laurence A. C. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010, 8:102 doi:10.1186/1477-7827-8-102.

Методы математической обработки результатов

При учете результатов с помощью встроенного или внешнего программного обеспечения спектрофотометра рекомендуется использовать следующие методы математической обработки результатов:

Марка спектрофотометра	Рекомендуемые методы математической обработки
Statfax 2100, 3200	Point-to-point
Tecan Sunrise	4 parameters
Bio-Rad 680	4 PL-Cook-Wilkenson
Multiscan EX	Point-to-point
Multiscan FC	4 parameter logistic

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 20 мкл калибраторов и контрольной сыворотки в двух повторах; по 20 мкл исследуемых сывороток в двух повторах		
2	Внести	По 100 мкл блок-раствора во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора		
3	Встряхнуть	В течение 30 секунд		
4	Инкубировать	Процедура 1 30 мин, шейкер, (37,0 ± 1,0)°C	Процедура 2 30 мин, термостат, (37,0 ± 1,0)°C	Процедура 3 60 мин, комнатная температура
5	Промыть планшет	3 раза, не менее 300 мкл рабочего промывочного раствора		
6	Внести	По 100 мкл конъюгата во все лунки		
7	Инкубировать	Процедура 1 30 мин, шейкер, (37,0 ± 1,0)°C	Процедура 2 60 мин, термостат, (37,0 ± 1,0)°C	Процедура 3 60 мин, комнатная температура
8	Промыть планшет	5 раз, не менее 300 мкл рабочего промывочного раствора		
9	Внести	По 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора во все лунки		
10	Инкубировать	Процедура 1 20-30 мин, в темноте	Процедура 2 20-30 мин, в темноте	Процедура 3 20-30 мин, в темноте
11	Внести	По 150 мкл стоп-реактанта		
12	Встряхнуть	В течение 5-10 секунд		
13	Учет результатов	450 нм		

14

1.2 АВГ 2014

Долгов В.В.

