

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ХГч-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения хорионического гонадотропина в сыворотке (плазме) крови «ХГч-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации хорионического гонадотропина в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Хорионический гонадотропин (ХГ) – гликопротеин, секретируемый трофобластическими клетками плаценты. Молекула ХГ состоит из двух нековалентно связанных полипептидных цепей: α - и β -субъединицы. Специфичность и биологическую активность гормона определяет его β -субъединица. Концентрацию ХГ в моче и сыворотке крови определяют для ранней диагностики беременности. При многоплодной беременности уровень ХГ в сыворотке значительно превышает соответствующие сроку нормы. Напротив, внематочная беременность и плацентарная недостаточность характеризуются снижением этого показателя. Определение ХГ в сыворотке крови во втором триместре беременности (наряду с АФП и эстриолом) входит в программу обследования для выявления синдрома Дауна. Кроме того, ХГ является основным лабораторным диагностическим маркером хориоэпителиомы и других трофобластических опухолей и хорошо отражает эффективность проводимой противоопухолевой терапии. В данной тест-системе в качестве антитела «захвата» используется моноклональное антитело, специфичное для β -субъединицы; проявление связанного антигена проводится с помощью моноклонального антитела, специфичного для α -субъединицы; таким образом определяется только интактная молекула ХГ.

1.2. Функциональное назначение. Определение хорионического гонадотропина (ХГ) в сыворотке (плазме) крови используется в качестве вспомогательного метода для диагностики беременности, в том числе многоплодной, внематочной и неразвивающейся, для выявления задержек в развитии плода, угрозы самопроизвольного аборта, недостаточности функции плаценты, для диагностики аменореи, а также для диагностики опухолей, продуцирующих ХГ, для всех групп населения.

1.3. Набор предназначен для диагностики *ин vitro*.

1.4. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение хорионического гонадотропина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к β -субъединице хорионического гонадотропина человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание ХГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к альфа-цепи ЛГ/ФСГ/ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с субстратным раствором тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации хорионического гонадотропина в исследуемом образце. Концентрацию хорионического гонадотропина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания хорионического гонадотропина в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая специфичность.

При тестировании тестового пула сывороток с известной концентрацией ХГ путём добавления пула с известным содержанием предполагаемых интерферирующих веществ с помощью Набора «ХГч-ИФА» ни одна из испытанных проб не показала наличие перекрёстной реактивности.

Аналит	Перекрёстная реакция, %
ЛГ	< 0.1
ФСГ	< 0.1
ТТГ	< 0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ХГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ХГч-ИФА» не превышает 8.0 %.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации ХГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ХГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций С2-С6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ХГ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы С3. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ХГч-ИФА» концентрация ХГ в сыворотке (плазме) крови не превышает 1.25 МЕ/л.

3.6. Интерсепт – значения концентраций ХГ (МЕ/л), при которых соотношение ВС1/ВС6 соответствует 20%, 50% и 75%. Пределы указаны в аналитическом паспорте.

3.7. Интерференция.

На результаты анализа не оказывало влияния использование антикоагулянтов ЭДТА, гепарина и цитрата натрия, а также присутствие гемоглобина, триглицеридов, холестерина, билирубина и общего белка в концентрациях, не превышающих нормальные клинические значения.

3.8. Референтное значение.

В Наборе «ХГч-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/л. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в МЕ/л следует умножить на 0.2.

$$1 \text{ МЕ/л} = 0.2 \text{ нг/мл.}$$

Исследуемая группа	Единицы, МЕ/л		Единицы доп., нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	-	15	-	3,0
Женщины	-	15	-	3,0
Беременные:				
1 неделя	-	50	-	10,0
2 неделя	20	500	4,0	100
3 неделя	500	5000	100	1000
4 неделя	3000	19000	600	3800
5-8 недели	14000	169000	2800	33800
9-13 недели	16000	180000	3200	36000
14 неделя	27500	110000	5500	22000
15 неделя	21400	85600	4280	17120
16 неделя	19200	76800	3840	15360
17 неделя	16400	65600	3280	13120
18 неделя	12800	51200	2560	10240
19 неделя	11500	46000	2300	9200
20 неделя	10500	42000	2100	8400
21 неделя	9000	36000	1800	7200
22 неделя	4500	70000	900	14000
23 неделя	3000	69500	600	13900
24-26 неделя	2400	55000	480	11000
27-40 неделя	2400	50000	480	10000

Медианы и СКО (рекомендуемый диапазон норм 0.5-2.0 MOM)

Беременные, неделя	Медиана, МЕ/л	СКО
14 неделя	55000	0.83
15 неделя	42800	0.78
16 неделя	38400	0.74
17 неделя	32800	0.75
18 неделя	25600	0.69
19 неделя	23000	0.56
20 неделя	21000	0.52
21 неделя	18000	0.51

В соответствии с правилами GLP (Good Laboratory Practice, надлежащая Лабораторная практика), рекомендуется каждой лаборатории уточнить параметры референтного интервала, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций ХГ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (1.25 МЕ/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (С6 МЕ/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация ХГ ниже 1.25 МЕ/л или выше С6 МЕ/л.

3.9. Хук-эффект.

Вероятность Хук-эффекта исследовалась путем тестирования образцов с высокой концентрацией ХГ и их разведения. Не наблюдались отрицательные результаты на неразведенных образцах по сравнению с разведенными образцами. Идентичность результатов неразведенных и разведенных образцов указывает на отсутствие Хук-эффекта до концентрации 5000 МЕ/л.

3.10. Метрологическая прослеживаемость осуществлялась с использованием международного эталонного образца с известным содержанием ХГ (WHO International Standard 5st WHO IS Chorionic Gonadotrophin, code 07/364).

4. СОСТАВ НАБОРА

Символ	Состав	Описание	Кол-во компонентов
1	Планшет 96-луночный	полистироловый, стрипированный, на внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к β -субъединице хорионического гонадотропина человека, готов к использованию.	1 шт.
2	Калибровочные пробы	на основе фосфатного буфера, содержащие известные количества хорионического гонадотропина - 0; 15; 60; 125; 250; 500 МЕ/л, концентрация хорионического гонадотропина в калибровочных пробах указана в аналитическом паспорте и на этикетках флаконов, калибровочные пробы С2-С6 - прозрачные окрашенные жидкости (цвет компонента указан в аналитическом паспорте), калибровочная проба С1 - прозрачная бесцветная жидкость, готовы к использованию	6 флаконов (по 0.8 мл)
3	Контрольная сыворотка	инактивирована, на основе сыворотки крови человека с известным содержанием хорионического гонадотропина, прозрачная бесцветная жидкость готова к использованию	1 флакон (0.8 мл)
4	Конъюгат	прозрачная окрашенная жидкость (цвет компонента указан в аналитическом паспорте), готов к использованию.	1 флакон (14 мл)
5	ИФА-БУФЕР	прозрачная окрашенная жидкость (цвет компонента указан в аналитическом паспорте), готов к использованию.	1 флакон (100 мл)
6	Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ)	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию.	1 флакон (14 мл)
7	Концентрат отмывочного раствора	прозрачная бесцветная жидкость, 26-кратный концентрат	1 флакон (22 мл)
8	Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию.	1 флакон (14 мл)
9	N003	Бумага для заклеивания планшета	2 шт
10	K205I	Инструкция по применению Набора реагентов «ХГч-ИФА»	1 шт
11	K205IQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ХГч-ИФА»	1 шт

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2б.

5.2. Образцы сыворотки крови человека, используемые при приготовлении контрольной сыворотки, инактивированы и не содержат антиген вируса гепатита В (HBsAg), антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ 1, 2 и антигена р24 ВИЧ-1.

5.3. Набор предназначен только для профессионального использования.

5.4. Все компоненты Набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.5. 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.

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

5.7. 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.

5.8. При работе следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905 (ISO 15190:2003) «Лаборатории медицинские Требования безопасности».

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

5.10. При использовании согласно инструкции по применению изделие является безопасным (не несет физических, экологических и иных рисков).

5.11. Набор «ХГЧ-ИФА» не содержит лекарственных средств для медицинского применения.

5.12. Показания к применению медицинского изделия: применять в соответствии с назначением.

5.13. Противопоказания к применению медицинского изделия: противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет. Не применять не по назначению.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие дозировать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве анализируемого образца используется сыворотка (плазма) крови.

7.1. Процедура получения анализируемого материала. Сбор образцов крови человека проводить в соответствии с текущей практикой методом венепункции, соблюдая стандартные лабораторные процедуры. Для анализа использовать неразведённую сыворотку (плазму) крови.

7.2. Подготовка анализируемых образцов. Во избежание гемолиза необходимо как можно быстрее отделить плазму от эритроцитов или сыворотку от сгустка. Выбор пробирок для получения сыворотки или плазмы, подготовку, центрифугирование, хранение и транспортировку образца производить согласно правилам проведения преаналитического этапа, утвержденным для лаборатории. Рекомендуемое соотношение антикоагулянта и биоматериала, а также способы подготовки образца и режимы центрифугирования описаны в инструкции по применению пробирок, используемых лабораторией.

7.2.1. Приготовление анализируемых образцов сывороток крови пациентов. Кровь отобрать венопункцией, дать полностью свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре.

7.2.2. Приготовление анализируемых образцов плазмы пациентов. Сбор крови производить в пробирки, содержащие антикоагулянты, согласно утвержденной процедуре сбора плазмы, после сбора центрифугировать. В качестве антикоагулянтов использовать ЭДТА, гепарин и цитрат натрия.

7.3. Если анализ проводится не в день взятия, образцы сыворотки, плазмы крови, следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 7 суток или при температуре -20 °С не более 2 месяцев. Допускается однократное размораживание/ замораживание образцов. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

7.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

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

7.6. Перед проведением анализа исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови, следует выдержать при комнатной температуре +18...25 °С не менее 30 мин.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

8.2. Приготовление планшета. Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

8.3. Приготовление отмывочного раствора. Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8.4. Для исключения ложно заниженных результатов (т.н. «хук-эффект») не допускается исследование образцов сыворотки (плазмы) крови беременных без предварительного разведения ИФА-Буфером. Если определение концентрации ХГ в сыворотке (плазме) проводится в целях первичной диагностики беременности (ранние сроки беременности), образец необходимо одновременно исследовать

без разведения (цельная сыворотка (плазма)) и с фактором разведения 1:20. Обязательные разведения исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови в зависимости от недели беременности:

1-2 неделя - без разведения;

3-4 неделя - 1:20;

4-14 неделя - 1:400;

14-21 неделя - 1:400; 1:1000;

22 неделя, 3-й триместр - 1:400.

Пример разведения исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови:

1:20 – добавить 25 мкл образца в 475 мкл ИФА-Буфера;

1:400 – добавить 25 мкл разведения 1:20 в 475 мкл ИФА-Буфера;

1:1000 – добавить 200 мкл разведения 1:400 в 300 мкл ИФА-Буфера.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Информация, об особенностях транспортирования должна учитываться всеми лицами, участвующими в хранении, перевозке и утилизации (уничтожении) этого изделия.

9.1. Транспортирование.

9.1.1. Транспортирование Набора реагентов «ХГч-ИФА» должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре +2...+8 °С. Допускается транспортировка Набора при температуре до +25°С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого Набора.

9.1.2. Транспортирование изделий при температурах, требующих соблюдения «Холодовой цепи», обеспечивающей сохранность температурного режима, должно осуществляться в термоконтейнерах одноразового пользования, содержащих хладоэлементы, или в термоконтейнерах многократного применения с автоматически поддерживаемой температурой или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов.

9.1.3. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

9.2. Хранение.

Хранение изделий и/или компонентов при температуре от +2...+8 °С должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Хранение светочувствительных изделий и/или компонентов должно осуществляться в темном месте. Хранение изделий ниже 0 °С должно осуществляться в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.2.1. Набор реагентов «ХГч-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение Набора при температуре до + 25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого Набора.

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

– оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;

– оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора, ИФА-Буфер, конъюгат, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ), стоп-реагент

после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Допускается однократное замораживание (-20°С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

- приготовленный отмывочный раствор хранить при температуре +2...+8 °С не более 45 суток, допускается хранение при комнатной температуре +18...+25 °С не более 15 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

9.2.3. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

9.2.4. Срок годности Набора реагентов «ХГч-ИФА» - 18 месяцев.

9.3. Эксплуатация.

Все варианты комплектаций набора предназначены для ручной постановки и для постановки на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа с возможностью, как дробного использования планшета (набора), так и для постановки целого планшета (набора).

Потенциальный потребитель – врачи клиничко-диагностических лабораторий. Профессиональная квалификационная группа «Врачи и провизоры» всех уровней (Приказ №526 от 06.08.2007 г «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»). Медицинский персонал клиничко-диагностических лабораторий должен иметь документированное подтверждение проведенного обучения, связанного с потенциальным риском, сочетающимся с работой с любым медицинским (клиническим) лабораторным устройством.

9.3.1. При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

- не использовать Набор после окончания срока годности;
- не использовать Набор реагентов, если упаковка повреждена.
- не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат отмывочного раствора, стоп-реагента, субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ);
- 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 планшет во время проведения исследования.
- не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении иммуноферментного анализа.

9.3.2. Все компоненты Набора реагентов «ХГч-ИФА» при соблюдении требований данной Инструкции стабильны в течение всего срока годности. Срок годности набора указан на внешней стороне упаковки.

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

9.3.4. Не используйте компоненты из других наборов.

9.3.5. Изделия и/или компоненты Набора реагентов «ХГч-ИФА» ремонту и техническому обслуживанию не подлежат.

9.4. Утилизация.

9.4.1. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

9.4.2. Медицинские отходы класса Б. Утилизацию или уничтожение наборов реагентов требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-93 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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

Предприятие-изготовитель гарантирует стабильность компонентов и Набора, а также соответствие Набора требованиям Технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов для 6 калибровочных проб, 1 пробы контрольной сыворотки и лунки для исследуемых образцов.
2	Если предполагаемая концентрация ХГ в исследуемом образце превышает С6 МЕ/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Если полученный результат С6 МЕ/л и выше - необходима повторная постановка с дополнительным разведением образца.
3	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
	Внесите в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл субстратного раствора тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
7	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
8	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.

9	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) - концентрация ХГ в калибровочных пробах (МЕ/л), ось ординат (y) - оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод или четырехпараметрический сплайн.
10	Определите по калибровочному графику содержание ХГ в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили, умножьте полученный результат на фактор разведения.

11. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

11.1. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации ХГ в контрольной сыворотке.

11.2. Набор реагентов «ХГЧ-ИФА» предназначен для диагностических целей, однако окончательный диагноз не должен основываться только на результатах данного теста.

11.3. Диагноз должен быть поставлен врачом после полного клинического и лабораторного обследования пациента

12. ЛИТЕРАТУРА

1. Krieg, A.F. Pregnancy Tests and Evaluation of Placental Function. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 16th ed. Henry, J.B. editor, W.B. Saunders Co. Philadelphia. app. 680, 1979.
2. Brody, S., and Carlstrom, G., Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin in Normal and Pathologic Pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 22: 564, 1962.
3. Braunstein, G.D., Rasor, J., Adleer, D., et al: Serum Human Chorionic Gonadotropin Levels Throughout Normal Pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 126: 678, 1976.
4. Skinner, M.S., Seckinger, D., Evaluation of Beta-Subunit Chorionic Gonadotropin as an Aid in Diagnosis of Trophoblastic Disease. Ann. Clin. Lab. Sci., 9 (4): 347-52, 1979.
5. Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J.L., Carbone, P.P., and Ross, G.T., Ectopic Production of Human Chorionic Gonadotropin by Neoplasms. Ann. Intern. Med., 78: 39-45, 1973.

По вопросам, касающимся качества Набора «ХГ-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)
электронная почта: rqc@xema.ru; info@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com
Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HCG IN HUMAN SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of hCG in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of hCG in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Human chorionic gonadotropin (HCG) is a glycoprotein hormone secreted by trophoblastic cells of placenta. A molecule of HCG consists of two noncovalently bound subunits: alpha- and beta-HCG. Beta-subunit is specific for HCG hormone.

Determination of HCG is widely used for early diagnosis of pregnancy. Multiple pregnancy results in correspondent elevation of serum HCG; while ectopic pregnancy and placental insufficiency cause decreased serum HCG levels. Determination of HCG in serum during second trimester is used for pregnancy monitoring, especially in screening for Down syndrome, along with other laboratory tests (AFP and Estriol).

Serum HCG is also a laboratory marker of trophoblastic tumours – chorionepitheliomas, some seminomas and teratomas. Serial determination of serum HCG can be used for therapy monitoring in these cancers.

The present test system uses beta (β)-chain specific monoclonal antibody as the capture, and alpha (α)-chain specific monoclonal antibody as the tracer; therefore only the whole intact HCG molecule is detected.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to β chain of hCG-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to α chain of hCG, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5.0% H_2SO_4 . It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Material Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Material Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	hCG EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 6 calibrators: 0, 15, 60, 125, 250, 500 IU/l	6	pcs	blue (CI - colourless)	2 months
3	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	Conjugate, 14 ml	1	pcs	red	until exp.date
5	EIA buffer 100 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6	Substrate solution, 14 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7	Washing solution concentrate 26X, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 45 days at 2-8 °C or 15 days at RT
8	Stop solution, 14 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10	Instruction hCG EIA	1	pcs		N/A
11	QC data sheet hCG EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 26X by 26 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note: It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Alternative units: 1 IU/l = 0.2 ng/ml

7.5. Highdose hook effect. A high-dose hook effect is possible in kits of this nature. To avoid falsely low results, samples obtained from pregnant women should be diluted accordingly before assaying:

Week 1-2 of gestation – no dilution

Week 3-4 – 1:20

Week 4-14 – 1:400

Week 14-21 – 1:400 and 1:1000 (both dilutions should be assayed)

Week 22, 3rd trimester – 1:400.

Dilution examples:

1:20 – 25 µl of sample + 475 µl of EIA buffer

1:400 – 25 µl of 1:20 dilution + 475 µl of EIA buffer

1:1000 – 200 µl of 1:400 dilution + 300 µl of EIA buffer.

If pregnancy status is not clear but suspected, the sample should be assayed both undiluted and diluted 1:20.

7.6. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 14 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using DIL SPE (EIA buffer) (see p 7.5). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 26X dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 26X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator
12	Apply point-by-point method for data reduction.

7.7. Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

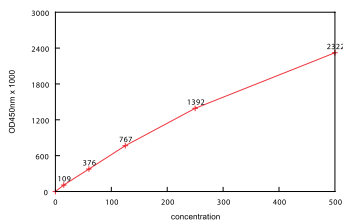
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus hCG concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of hCG in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 IU/l	0.04
CAL 2	15 IU/l	0.15
CAL 3	60 IU/l	0.41
CAL 4	125 IU/l	0.81
CAL 5	250 IU/l	1.43
CAL 6	500 IU/l	2.36



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for hCG. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, IU/l		Units alternative, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
Males	-	15	-	3.0
Females	-	15	-	3.0
Pregnancy week:				
1	-	50	-	10.0
2	20	500	4.0	100
3	500	5000	100	1000
4	3000	19000	600	3800
5-8	14000	169000	2800	33800
9-13	16000	180000	3200	36000
22	4500	70000	900	14000
23	3000	69500	600	13900
3rd trimester	2400	50000	480	10000

Pregnancy, week	Median, kIU/l	SKO
14	55	0.83
15	42.8	0.78
16	38.4	0.74
17	32.8	0.75
18	25.6	0.69
19	23	0.56
20	21	0.52
21	18	0.51

11. PERFORMANCE CHARACTERISTIC

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
LH	<0.1
FSH	<0.1
TSH	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 1.25 IU/l.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different hCG concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known hCG concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. Krieg, A.F. Pregnancy Tests and Evaluation of Placental Function. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 16th ed. Henry, J.B. editor, W.B. Saunders Co. Philadelphia. app. 680, 1979.
2. Brody, S., and Carlstrom, G., Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin in Normal and Pathologic Pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., 22: 564, 1962.
3. Braunstein, G.D., Rasor, J., Adleer, D., et al: Serum Human Chorionic Gonadotropin Levels Throughout Normal Pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 126: 678, 1976.
4. Skinner, M.S., Seckinger, D., Evaluation of Beta-Subunit Chorionic Gonadotropin as an Aid in Diagnosis of Trophoblastic Disease. Ann. Clin. Lab. Sci., 9 (4): 347-52, 1979.
5. Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J.L., Carbone, P.P., and Ross, G.T., Ectopic Production of Human Chorionic Gonadotropin by Neoplasms. Ann. Intern. Med., 78: 39-45, 1973.