

НАБОР свободный βчХГ [¹²⁵I] IRMA

(Номер по каталогу: RK-820CT)

Система ¹²⁵I-свободный βчХГ IRMA позволяет проводить прямое количественное определение *in vitro* β-субъединицы человеческого хорионического гонадотропина (βчХГ) в сыворотке крови человека. Количественное определение свободного βчХГ может проводиться в диапазоне 0-100 мМЕ/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 50 мкл.

Введение

Человеческий хорионический гонадотропин (чХГ) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 38000, секретируемый трофобластами плаценты. Он состоит из двух субъединиц, α-субъединица является общей для всех гликопротеиновых гормонов, β-субъединица отвечает за иммунологическую и биологическую специфичность. В кровотоке циркулируют свободные формы обеих субъединиц.

При нормальном течении беременности до 10-й недели наблюдается экспоненциальный рост как голо-чХГ, так и его β-субъединицы. Затем концентрация чХГ постепенно снижается. Максимальный уровень данного гликопротеина может составлять до 100 мМЕ/мл.

Значительный рост свободного βчХГ в сыворотке крови матери считается специфичным и чувствительным диагностическим маркером гестационного трофического новообразования (ГТН), включая пузырный занос (инвазивный и неинвазивный) и хориокарциному. Также его определение может являться скрининговым методом, так как появление свободного βчХГ после хирургического вмешательства свидетельствует о рецидиве опухолевого процесса.

Данный набор может использоваться для оценки риска развития синдрома Дауна (Трисомия 21) наряду с другими биохимическими и ультразвуковыми показателями, а также прочими данными (возраст и вес матери), при этом используется валидированное программное обеспечение для оценки риска развития синдрома Дауна (*см. Приложение*):

Комбинированный тест: определение в первом триместре беременности сывороточного АБПП-А матери, свободного βчХГ, а также толщины воротникового пространства (ВП) плода с помощью ультразвукового исследования.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител.

Данное количественное определение состоит из двух этапов, необходимых для элиминации мешающих факторов. На первом этапе образец сыворотки инкубируется в пробирках, покрытых стрептавидином, с моноклональным биотин-меченным антителом (захват). В течение 1 часового периода инкубирования при непрерывном перемешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок. Затем пробирки тщательно промывают. На втором этапе добавляется моноклональное антитело, меченное ¹²⁵I (сигнальная молекула), и оно связывается с эпитопом молекулы свободного βчХГ, которая отличается от молекулы, которая распознается немеченным захватывающим антителом. Это приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело – антиген – сигнальное антитело, которое также называется «сэндвич». Затем реакционную смесь сливают, пробирки тщательно промывают и производят подсчет радиоактивности в гамма-счетчике. Концентрация антигена обратно пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество βчХГ, может быть определена искомая концентрация βчХГ в образцах пациента.

Содержание набора

- 1 флакон МЕТКИ (32 мл), готовой к использованию. Содержит около 740 кБк ¹²⁵I-анти-βчХГ в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.
- 1 флакон АНТИСЫВОРОТКИ (21 мл), готовой к использованию, содержащий иммобилизованные анти-свободный βчХГ антитела в буфере с синим красителем и 0,1% NaN₃.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (6 x 0,5 мл), содержащих (S₁-S₆) 0, 0,1, 0,5, 2, 10, 100 мМЕ/мл свободного βчХГ (ВОЗ IRP 75/551) в бычьей сыворотке с 0.1% NaN₃.
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ 1,0 мл (сыворотка крови человека) с 0,1% NaN₃. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованных в пластиковые коробки.
- 2 флакона КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (2 x 20 мл), с 0.2% NaN₃. См. *Приготовление реактивов*. Сертификат качества Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (50, 200, 300 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой

смеситель, шейкер, полимерная пленка абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром объемом 1,5 л (вместо пипеток 2 мл)

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть приготовлены в соответствии со стандартными процедурами, применяемыми в клинической лабораторной практике. Образцы можно хранить при температуре 2-8 °С в случае, если анализ будет проводиться в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°С). Перед анализом образцы необходимо разморозить и тщательно перемешать. Запрещается использовать липемичные, гемолизированные и мутные образцы, так как они могут давать ложноотрицательные результаты. Следует избегать повторного замораживания / размораживания образцов.

Приготовление и хранение реактивов

Для того, чтобы получить 720 мл промывного раствора, добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды. Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С до истечения срока годности набора.

После открывания реактивы следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до истечения срока годности набора. Фактический срок годности указан на упаковке и в сертификате качества.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте два экземпляра пробирок с покрытием для каждого из стандартов (S₁-S₆), контрольной сыворотки и образцов.
3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы путем аккуратного перемешивания. Избегайте пенообразования.
4. Внесите пипеткой по 50 мкл стандартов, контроля и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Для фиксации пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок по 200 мкл антисыворотки.

6. Запечатайте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и установите необходимую скорость с тем, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
7. Инкубируйте пробирки в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании.
8. Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.
9. Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 8 еще раз.
10. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок по 300 мкл метки.
11. Запечатайте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и установите необходимую скорость с тем, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
12. Инкубируйте пробирки в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании.
13. Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.
14. Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 13 еще два раза.
15. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик минимум на 60 секунд.
16. Рассчитайте концентрацию свободного βЧХГ в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов» или используйте для этого специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Всего	Стандарт	Контроль	Образец
Стандарт		50		
Контроль			50	
Образец				50
Антисыворотка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Промывочный		2000	2000	2000

буфер				
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Метка	300	300	300	300
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге				
Подсчитайте радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение радиоактивности в минуту (CPM) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца, соответственно, с использованием следующей формулы:

$$V/T(\%) = \frac{S_{2-6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_1 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте калибровочную кривую, откладывая рассчитанные значения V/T (%) для каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации свободного βЧХГ по другой.

Определите концентрацию свободного βЧХГ в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных компьютерных программ для обработки данных в данном случае возможно использовать логит-преобразование или сплайновые методы. Также возможно использование автоматизированной системы обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Количество cpm	Среднее значение cpm	V/T%
T	307023 304769	305896	-
S1	275 245	260	0.09
S2	462 445	454	0.06
S3	1257 1215	1236	0.32
S4	4369 4386	4377	1.35

S5	21050 21309	21179	6.84
S6	131921 131102	131512	42.91
C	25652 26316	25984	8.41

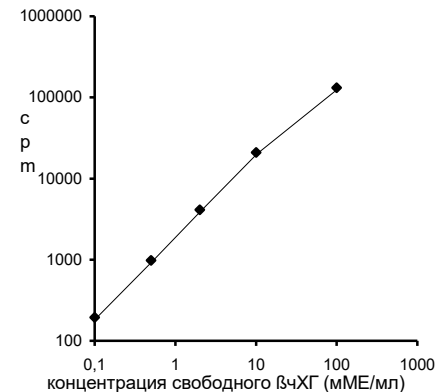


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для подсчета значений образцов)

Характеристика количественного определения

Типичные параметры количественного определения

NSB/T < 0,3%

Чувствительность

Значение аналитической чувствительности, которое составило 0,02 мМЕ/мл, было получено в результате количественного определения 15 копий нулевого стандарта. Чувствительность была определена как концентрация, соответствующая сумме среднего значения cpm и его двух стандартных отклонений.

Эффект крючка

При концентрациях свободного βЧХГ до 2500 мМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует.

Специфичность

Моноклональные антитела, которые используются в данном наборе IRMA являются специфичными для свободного βЧХГ. При нормальных физиологических концентрациях не было выявлено перекрестной реактивности с чФСГ, чЛГ и чТСГ.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариабельности были проанализированы 4 образца сыворотки в 15 повторах. Для определения межсубъектной вариабельности образцы измерялись дважды в 15 независимых анализах, с использованием наборов из различных партий. Ниже представлены полученные значения.

Внутрисубъектная вариабельность		Межсубъектная вариабельность	
Среднее значение (МЕД/мл)	Кoeffициент вариации (%)	Среднее значение (МЕД/мл)	Кoeffициент вариации (%)
4,93	1,8	4,69	4,1
9,02	1,1	8,63	3,6
14,33	3,4	12,8	5,4
41,38	1,1	38,0	9,0

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным уровнем свободного βчХГ. Средний процент восстановления для 3 образцов сыворотки с пиковыми значениями свободного βчХГ на 5 уровнях составлял: 99.2 ± 5.5 (среднее \pm СО).

Тест разведения (линейность)

Исследование 4 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Ниже приведена формула для расчета измеренной концентрации (X) в зависимости от ожидаемой концентрации (Y), которая демонстрирует хорошую линейность:

$$y = 1.015x - 0.0316 \quad R = 0,9995 \quad n = 20$$

Ожидаемые значения

Здоровые взрослые (кроме беременных женщин):
< 0,1 мМЕ/мл

В первом триместре беременности:

Неделя беременности	1 КМ (мМЕ/мл)	N
10	51.19	6
11	44.67	163
12	38.9	821
13	34.4	399

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственный диапазон эталонных значений для своей популяции пациентов. Полученные результаты следует интерпретировать только в контексте общей клинической картины. Ни один из диагностических наборов *in vitro* не может быть использован в качестве единственного доказательства наличия какого-либо заболевания либо нарушения. Каждые три месяца значения КМ должны проверяться и, при необходимости, пересчитываться.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы эти пробирки не смешались с обычными пробирками для проведения исследований. Для минимизации

риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования. Пробирки для количественного определения

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное перемешивание может стать причиной низкой эффективности

3) **Добавление промывного буфера.** При добавления промывочного буфера рекомендуется использовать обычный лабораторный диспенсер со стеклянной емкостью объемом 1,5 л и гибкий выпускник. При отсутствии данного оборудования можно использовать шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были индивидуально протестированы с использованием утвержденных методов (иммуноферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1) и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg).

Следует всегда соблюдать осторожность при обращении с человеческими образцами, которые должны быть протестированы диагностическими наборами. Даже если объект был протестирован, все равно ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) или других инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека всегда стоит обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Химическая опасность

Компоненты содержат в качестве антибактериального агента азид натрия. При утилизации отходов их необходимо смывать большим количеством воды для

предотвращения накопления взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Общее содержание азидов в каждой упаковке составляет 93 мг.

	Срок годности	CONTROL	Контроль
	Номер партии	CAL	Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам	CT	Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность	TRAC	Метка
	См. руководство по использованию	AS	Антисыворотка
	Устройство для проведения диагностики <i>in vitro</i>	WASHB	Промывной буфер
	Производитель		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
	Радиоактивный материал	REF	Номер по каталогу

CE1011

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический

immuno@izotop.hu

e-mail:

Коммерческий

commerce@izotop.hu

e-mail:

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: +36-1-392-2577,

Факс: +36-1-395-9247

Версия: май 2021 г.

Приложение к инструкции по использованию наборов для оценки риска развития синдрома Дауна

Данный набор был валидирован для оценки риска развития Трисомии 21 с использованием следующих наборов и программного обеспечения:

Название набора / программного обеспечения	Код	Производитель
РАРР-А IRMA	RK-4 CT	Institute of Isotopes Ltd.
Свободный βчХГ IRMA	RK-820CT	Institute of Isotopes Ltd.
АФП IRMA	RK-800 CT	Institute of Isotopes Ltd.
чХГ RIA	RK-770 CT	Institute of Isotopes Ltd.
Неконтюогированный эстриол RIA	RK-3 CT	Institute of Isotopes Ltd.
Активный Ингибин-А ELISA	DSL-10-28100	DSL - Beckman Coulter
альфа – антенатальное скрининговое программное обеспечение для выявления синдрома Дауна и дефектов нервной трубки		Logical Medical Systems Ltd.

Указанные выше наборы и программное обеспечение промаркированы CE. Они могут использоваться в комплексе для оценки риска развития трисомии 21, в соответствии с директивой 98/79 EC IVD, а также на основании оценки соответствия, проведенной авторизованным уполномоченным органом (CE1011).

Пересмотренные результаты валидации, связанные с эффективностью оценки риска:

Чувствительность

Метод скрининга	Количество проведенных тестов	Положительные случаи по результатам теста		Случаи, подтвержденные цитогенетическим тестом		Ложноположительные случаи	
		No.	%	No.	% от положительных тестов	No.	%
Комбинированный тест	1389	42	3,02	2	4,76	40	2,88
Четвертной тест	539	30	5,57	1	3,33	29	5,38
Интегрированный тест	1741	47	2,70	3	6,38	44	2,53

Специфичность

Метод скрининга	Количество проведенных тестов	Отрицательные случаи	Отрицательные случаи по результатам теста		Ложноотрицательные случаи
			No.	%	
Комбинированный тест	1389	1387	1345	96,97	1 (0,07)
Четвертной тест	539	538	508	94,42	0
Интегрированный тест	1741	1738	1691	97,30	0

Литература: см. www.izotop.hu

CE1011

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: +36-1-392-2577,

Факс: +36-1-395-9247