



Набір ІФА для визначення ЛЮДСЬКОГО ПЛАЗМОВОГО ПРОТЕЇНУ А, ПОЗВ'ЯЗАНОГО З ВАГІТНІСТЮ

Кат. № : EIA-2397
Кількість : 96
Виробник : DRG (США)

Методика від 04-2011
Версія 17.0

Увага: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції англійською мовою.

1. ВСТУП

1.1 Застосування

Цей набір є імуноферментним аналізом для кількісного діагностичного визначення *in vitro* пов'язаного з вагітністю плазма протеїну А (PAPP-A) в сироватці та плазмі.

1.2 Короткий опис

PAPP-A протеїн, синтезований плацентою, що розвивається. PAPP-A визначається у сироватці матері, його концентрація різко зростає після 7 тижня вагітності і його клінічне використання найбільш корисне в першому триместрі вагітності.

Низькі концентрації PAPP-A можуть бути корисним маркером антинатального скринінгу синдрому Дауна разом з віком і визначенням вільного бета-НСГ.

2. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір є імуносорбентним, ензимно-зв'язаним з солідною фазою і базується на принципі сандвіча. Мікропланшетки вкриті поліклональними анти-PAPP-A антитілами. Кратна кількість зразків з ендогенним PAPP-A інкубується в лунках з буфером зразку. Після інкубації незв'язані частки вимиваються. При наступній інкубації формується комплекс з анти-PAPP-A антитілом та пероксидазного кон'югату. Після додавання субстрату розвивається забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації PAPP-A у зразку.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro". Тільки для використання кваліфікованим персоналом.
2. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
3. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
4. Уникайте контакту зі стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
5. Не піпуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
6. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
7. Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати фальшиві результати.
8. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
9. Не використовуйте реагенти після закінчення дати придатності.
10. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
11. Не змішуйте реагенти різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
12. Хімікалії і приготвлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
13. Лист Даних Безпеки доступний по замовленню.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитраційні лунки:** 12 стрічок по 8 лунок, покритих поліклональними анти-PAPP-A антитілами.
2. **Стандарти (ліофілізовані):** 6 флаконів, 0,15 мл, із концентраціями після розведення: 0; 1; 2,5; 5; 15 і 30 мкг/мл. Конверсія 1мО/мл = 4,5 мкг/мл. Стандарти містять <0,3% проклін в якості консерванту.

3. **Контроль (низький та високий):** 2 флакони (ліофілізовані) по 0,15 мл. Містить 0,015% БНД та 0,010% МІТ в якості консерванту.
4. **Робочий буфер:** 1 флакон на 25 мл.
5. **Ферментний кон'югат:** x10 концентрований, 1,5 мл, містить пероксидазу. Містить <0,03% проклін, 0,015% БНД та 0,010% МІТ в якості консерванту.
6. **Розчинник кон'югату:** 1 флакон, 14 мл. Містить <0,03% проклін, 0,015% БНД та 0,010% МІТ в якості консерванту.
7. **Розчин субстрату:** ТМБ, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання.
8. **Стоп-розчин:** 1 флакон, 14 мл, містить 0,5М H₂SO₄. Готовий до використання. Уникати контакту зі стоп-розчином. Він може викликати подразнення шкіри та опіки.
9. **Промивний розчин:** 1 флакон, 30 мл, x40 концентрований.

* БНД = 5-бромо-5-нітро-1,3-діоксан
МІТ = 2-метил-2Н-ізотіазол-3-один

Примітка: Додатково нульовий стандарт для розведення зразків наявний на запит.

4.2 Матеріали, що не постачаються, але необхідні

- Мікротитраційний відкалібрований рідер (450 нм±10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер (60 хв.).
- Напівогарфімічний графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8°C активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8°C.

Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний два місяці при зберіганні, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40х концентрованого промивного розчину.

Розведіть 25 мл концентрованого промивного розчину 975 мл деіонізованої води до об'єму 1000 мл.

Примітка: розведений промивний розчин стабільний впродовж 2 тижні при КТ.

4.5 Знищення набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

5. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма (ЕДТА, гепаринова або цитратна плазма) можуть бути використані в аналізі.

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

Увага: зразки, які містять азид натрію не повинні використовуватись в аналізі.

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001); дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

Плазма:

Цілісну кров необхідно забрати в центрифужні пробірки, які містять антикоагулянти и центрифугувати негайно після забору.

(Наприклад, для EDTA плазми - Sarstedt Monovette – червона кришка - # 02.166.001; для гепаринової плазми - Sarstedt Monovette – оранжева кришка - # 02.165.001; для цитратної плазми - Sarstedt Monovette – зелена кришка - # 02.167.001)

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8°C до 5 днів перед дослідженням.

Якщо плазма EDTA зберігається при 2-8°C, її необхідно проаналізувати впродовж 48 год.

Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C. Після відтаювання зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок сироватки показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені 0 стандартом і проаналізовані повторно.

Для вирахування концентрацій необхідно брати до уваги коефіцієнт розведення.

Приклад:

Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл стандарт 0 (ретельно змішайте)

Розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл стандарту 0 (ретельно змішайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура дослідження

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

Всі стандарти, зразки і контролю повинні досліджуватись в дублікаті. Всі стандарти, зразки та контролю повинні досліджуватись паралельно, щоб умови дослідження були однаковими.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитраційних лунок у штативі.
2. Додайте по **10 мкл** кожного стандарту/контролю/зразку у відповідні лунки кожен раз з новою насадкою.
3. Додайте по **100 мкл** робочого буферу в кожну лунку. Ретельно перемішуйте впродовж 10 сек. На цьому етапі важливо провести повне змішування.
4. Інкубуйте **30 хв** при кімнатній температурі.
5. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки 3 рази розведеним промивним розчином (**400 мкл** на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.

Важливе зауваження:

Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.

6. Внесіть по **100 мкл** розведеного ферментного кон'югату (див. Підготовка реагентів) в кожну лунку.
7. Інкубуйте **30 хв** при кімнатній температурі.
8. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки 3 рази розведеним промивним розчином (**400 мкл** на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
9. Додайте **100 мкл** розчину субстрату в кожну лунку.
10. Інкубуйте **15 хв** при кімнатній температурі.
11. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **50 мкл** стоп-розчину в кожну лунку.
12. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10** нм за допомогою мікротитраційного планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання стоп-розчину.

6.3 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.

5. Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, чим концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити або вважати як > 30 мкг/мл. При вирахуванні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Стандарт	мкг/мл	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0	0	0,18
Стандарт 1	1	0,38
Стандарт 2	2,5	0,56
Стандарт 3	5	0,83
Стандарт 4	15	1,44
Стандарт 5	30	1,80

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

7.1 Вагітна жінка – 1-ий триместр

238 зразків вагітних жінок на першому триместрі були вирахувані за допомогою даного набору. Значення оцінювались при порівнянні з дистрибуцією Gaussian.

Приймаючи до уваги вагу тіла і день вагітності, результати показані в наступному рівнянні регресії:

$$\text{Медіана (f) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.12268 + 0.06324 * \text{день вагітності} - 0.00979 * \text{вага тіла})$$

Якщо значення тих самих 238 вагітних жінок порівнювались тільки з днем вагітності (вага тіла не приймається до уваги), отримали наступне рівняння регресії:

$$\text{Медіана (sst) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.705444 + 0.0618725 * \text{день вагітності})$$

На діаграмі (див. Оригінал інструкції) і в таблиці (табл. 1) була вичислена функція медіани **вагітних жінок 8-13 тижня** для трьох значень ваги тіла (50, 65 (середня вага тіла) і 100 кг). Для порівняння медіани також були визначені вручну (медіана тижня) і використовуючи рівняння регресії залежності від ваги (медіана sst).

Популяція і лабораторна різниця можуть привести до незначних диференціацій медіани. Кожна лабораторія таким чином повинна визначити і подальше обновлювати власні медіани їх пацієнтів. Рівняння регресії і дані таблиці можуть використовуватись як рекомендовані. Вичислення медіани і/або функції регресії для ви числення медіан власних пацієнтів повинно проводитись з використанням програмного забезпечення. Медіани визначені для DRG PAPP-A ELISA не можуть використовуватись для аналізу інших виробників. Медіани, визначені для PAPP-A аналізу інших виробників не можуть використовуватись для DRG PAPP-A ELISA. (Див. таблицю в кінці інструкції).

7.1.1 Використання для вивчення синдрому Дауна

Через ризик обчислення пренатального вивчення PAPP-A концентрації подаються як MOM (множина медіан, MOM= Виміряна концентрація (PAPP-A) / Медіана PAPP-A).

При синдромі Дауна медіана MOM для PAPP-A збільшується під час першого триместра і не нормалізується потім до нормального рівня під час другого триместра. Таким чином, PAPP-A потрібно визначити в першому триместрі вагітності (повні тижні 10-13).

Тиждень вагітності	10	11	12	13	14-20
Медіана MOM при синдромі Дауна	0,34	0,42	0,50	0,58	1,11

Через ризик ви числення трисомії 21 не тільки PAPP-A, але й інші параметри як 6-ХГЧ вільний і NT для 1-го триместру і/або АФП і ХГЧ для 2-го триместра повинні бути визначені.

Використання цих параметрів через ризик обчислення трисомії 21 потребує спеціального забезпечення. Відповідно до IVD Директиви (98/79/EC) і забезпечення і набори для додаткових аналізів повинні підходити для трисомії 21 вивчення і СЕ-сертифіковані реєстрацію корпусу, позначаючи ідентифікаційним номером реєстрації корпусу на СЕ-відмітці на забезпеченні і наборі. Забезпечення повинно давати можливість обчислення медіан власних вимірювань пацієнтів. Наполегливо рекомендується приймати до уваги додаткові фактори, як вік жінки, вагу, етнічну групу і палить чи не палить.

Недооцінювання терміну вагітності може привести до помилково завищених результатів (помилково позитивних). Для зменшення ризику цієї помилки важливо визначати термін вагітності максимально точно. Термін вагітності від останнього менструального циклу знижує високий ризик варіації. Сонографічне визначення CRL, або BIP рекомендується для належного визначення терміну вагітності.

Вимірювання PAPP-A при пренатальному обслідуванні визначає тільки ризик трисомії 21.

Для доказів трисомії 21 генетичне визначення також є необхідним.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролю згідно державним і федеральним правилам. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0,133-30 мкг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Антитіло, що використовується в DRG PAPP-A ELISA є специфічним до людського PAPP-A. Немає перехресної реактивності до інших типів.

Не спостерігається реакція для нормальної людської плазми.

9.3 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість визначена як середнє за мінусом 2 стандартних відхилень (20 реплікантів) аналізу стандарту 0 і склала 0,133 мкг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність в аналізі

Зразок	N	Середнє мкг/мл	КВ %
1	20	1,12	2,89
2	20	10,17	2,81

9.4.2 Варіативність між аналізами

Сироватка	N	Середнє мкг/мл	КВ %
1	12	1,18	7,18
2	12	10,94	5,72

9.5 Відновлення

Зразок	Введена конц. мкг/мл	Виміряна концентрація, мкг/мл	Очікувана концентрація мкг/мл	Відновлення %
1	—	19,89	19,89	100
	1,25	10,94	11,20	97,7
	2,50	12,00	12,45	96,4
	7,50	17,66	17,45	101,2
	15,00	24,78	24,95	99,3
2	—	2,17	19,89	100
	1,25	2,44	2,34	104,3
	2,50	3,44	3,59	96,0
	7,50	9,00	8,59	104,8
	15,00	15,77	16,09	98,1

9.6 Лінійність

Зразок	Розведення	Виміряна концентрація, нг/мл	Відновлення %
1	нерозвед.	20,90	100
	1:2	10,30	98,5
	1:4	5,39	103,1
	1:8	2,61	100,0
	1:16	1,25	95,8

2	нерозвед.	11,83	—
	1:2	5,80	98,1
	1:4	2,82	95,3
	1:8	1,45	98,1
	1:16	0,73	98,8

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводитиметься з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Перехресно діючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання PAPP-A в зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекта в цьому дослідженні до 300 мкг/мл PAPP-A.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні заключення

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.

ЛІТЕРАТУРА

(Див. в оригіналі інструкції).

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

ПМП «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

Повний тиждень вагітності	День вагітності	Медіана (sst), (залежно від ваги), мкг/мл	Медіана (f), (вага 50 кг), мкг/мл	Медіана (f), (вага 65 кг), мкг/мл	Медіана (f), (вага 100 кг), мкг/мл	Медіана тижня, мкг/мл
8	59	2,57	3,06	2,6	1,88	1,5
9	66	3,97	4,77	4,1	2,92	3,0
10	73	6,12	7,42	6,4	4,55	6,7
11	80	9,43	11,55	10,0	7,08	10,5
12	87	14,55	17,99	15,5	11,03	11,6
13	94	22,43	28,00	24,2	17,17	14,9