



Набір для кількісного визначення ЛЮДСЬКОГО ПЛАЗМОВОГО ПРОТЕЇНУ А, ЗВ'ЯЗАНОГО З ВАГІТНІСТЮ

Кат. № : 103-2397

Кількість : 96

Виробник : DRG International, Inc. (США)

Увага: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції на англійській мові.

Методика від 05-2007
Версія 14.0

ЗАСТОСУВАННЯ

Використовується для стратифікації ризику фетальної анеплоїдії в першому триместрі вагітності.

КЛІНІЧНІ ДАНІ

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-HCG.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

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.

ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro".
2. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Лист Даних 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 з Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
5. Не піпайте реактиви ротом і уникайте контакту реактивів і зразків з шкірою і слизовими.
6. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реактиви.
7. Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реактивами. Мікробіологічне забруднення реактивів чи зразків може дати фальшиві результати.
8. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
9. Не використовуйте реактиви після закінчення дати придатності.
10. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
11. Не змішуйте реактиви різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
12. Хімікалії і приготовлені чи використані реактиви повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
13. Лист Даних Безпеки доступний по замовленню.

РЕАГЕНТИ

1. **Титрувальна мікропланшетка:** 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. Містять 0,015% BND та 0,010% MIT як консерванта.
4. **Робочий буфер:** 1 флакон на 25 мл.

5. **Ферментний кон'югат:** x10 концентрований, 1,5 мл, містить пероксид азу. Містить <0,3% проклін в якості консерванту.
6. **Розчинник кон'югату:** 14 мл.
7. **Субстрат:** TMB, 14 мл
8. **Стоп-розчин:** 14 мл, містить 0,5M H₂SO₄.
9. **Контрольна сироватка:** 2 флакони (ліофіл.), 0,15 мл (дивись точне значення на флаконах). Містять <0,3% проклін в якості консерванту.
10. **Мийний розчин:** 30 мл, x40 концентрований.

МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Фотометр (450 нм±10 нм).
2. Калібровані мікропіпетки.
3. Дистильована вода.
4. Абсорбуючий папір.

ЗБЕРІГАННЯ

- При зберіганні при температурі 2-8°C активність реактивів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати.
- Вскриті набори повинні зберігатись при 2-8°C.
- Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8°C. Після відкриття ящика треба знову тісно його запечатати. Відкритий набір стабільний два місяця при зберіганні, як вказано вище.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Приведіть всі реактиви до кімнатної температури.

Стандарти: розчиніть ліофілізовані стандарти зі 150 мкл дистильованої води.

PAPP-A контрольна сироватка: розчиніть ліофілізовані стандарти 150 мкл дистильованої води.

Мийний розчин: розчиніть 30 мл концентрованого розчину 1170 мл деіонізованої води до об'єму 1,2 літра. Розведений мийний розчин стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.

Ферментний кон'югат: за 30 хв до використання розведіть 1,0 мл концентрованого кон'югату з 10 мл кон'югатного розчинника. Ензимний кон'югат повинен розводитись за 30 хв перед початком аналізу. Ензимний кон'югат не може зберігатись більше 24 годин. Якщо проводиться більше 1 тесту, розведіть тільки необхідну його кількість.

Знищення набору

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

Пошкодження набору

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

Збір зразків

Сироватка:

Збирайте кров, пунктуючи вену (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001); дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі.

Плазма:

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

(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)

Зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8°C 5 днів. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C. Після відтаювання зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі, зразок сироватки показує значення вище 30 мкг/мл, зразки можуть бути розведені 0 стандартом і проаналізований повторно.

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

ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

Загальні зауваження

Приведіть всі реактиви до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реактиви змішуйте без піноутворення.

1. Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.

- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реаканти 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.

СХЕМА ТЕСТУ

Всі стандарти, зразки і контролю повинні тестуватись в дублікаті, щоб умови тестування були однаковими.

- Виберіть необхідну кількість лунок.
- Додайте **10 мкл** Стандарту/Контролю/Зразку у відповідні лунки **кожний раз з новою насадкою**.
- Додайте **100 мкл** робочого буфера в кожну лунку.
- Інкубуйте **30 хв** при кімнатній температурі.
- Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки 3 рази розведеним мийним 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.
- Додайте **100 мкл** розведеного ферментного кон'югату в кожну лунку.
- Добре змішайте 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування на даному етапі
- Інкубуйте планшкетку **30 хв** при кімнатній температурі.
- Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки 3 рази розведеним мийним розчином. Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків
- Додайте **100 мкл** розчину субстрату в кожну лунку за ті самі часові інтервали.
- Інкубуйте **15 хв** при кімнатній температурі.
- Зупиніть реакцію, додавши **50 мкл** стоп-розчину в кожну лунку.
- Визначте абсорбцію кожної лунки при **450±10** нм на протязі 10 хв.

ВИРАХУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
- Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
- Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, чим концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити. При вичисленні концентрації цей фактор розбавлення необхідно врахувати.

Типовий приклад стандартної 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

ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

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

Вагітна жінка – 1-ий триместр.

238 зразків вагітних жінок на першому триместрі були вичислені 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:

$$\text{Медіана (f) PAPP-A} = \text{EXP} (-2,12268+0,06324*\text{день вагітності} - 0,00979*\text{вагу тіла}).$$

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 диференціальних 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 вичислення 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.

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 вичислення trisomy 21 не тільки PAPP-A, але й інші параметри як б-ХГЧ вільний і NT для 1-го триместра і/або АФП і ХГЧ для 2-го триместра повинні бути визначені.

Використання цих параметрів через ризик обчислення trisomy 21 потребує спеціального забезпечення. **Відповідно до IVD Директиви (98/79/ЕС) і забезпечення і набори для додаткових аналітів повинні підходити для trisomy 21 вивчення і CE-сертифіковані реєстрацією корпусу, позначаючи ідентифікаційним номером реєстрації корпусу на CE-відмітці на забезпеченні і наборі. Забезпечення повинно давати можливість обчислення медіан власних вимірювань пацієнтів.**

Настійно рекомендується приймати до уваги додаткові фактори, як вік жінки, вагу, етнічну групу і курить чи не курить. **Недооцінювання терміну вагітності може привести до фальшиво завищених результатів (фальшиво позитивних).** Для зменшення ризику цієї помилки важливо визначити термін вагітності максимально точно. Термін вагітності від останнього менструального циклу знижує високий ризик варіації. **Сонографічне визначення CRL або VIP** рекомендується для належного визначення терміну вагітності.

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

Для доказів trisomy 21 генетичне визначення також є необхідним.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0-30 мкг/мл.

Специфічність

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

Не спостерігається реакція для нормальної людської плазми.

Аналітична чутливість

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

Достовірність

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.

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

Сирова ватка	Введена конц. мкг/мл	Виміряна концентрація, мкг/мл	Очікувана концентрація мкг/мл	Відтворюваність %
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

ТЕСТ РОЗВЕДЕННЯ

Сирова тка	Фактор розведення	Виміряна концентрація, нг/мл	Відтворюваність %
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

Точність

Внутрітестова

Сироватка	N	середнє мкг/мл	КВ %
1	20	1,12	2,89
2	20	10,17	2,81

Міжтестова

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

ТАБЛИЦЯ 1.

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

Інформація для замовлення:

ПМП «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97,
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 77 51 22;
тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.com

