

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПЛАЦЕНТАРНОГО ФАКТОРА ЗРОСТАННЯ (PLGF) У СИРОВАТЦІ ЛЮДИНИ

RE52361, PLGF ELISA

Каталог. № : RE52361
Кількість : 96
Виробник : IBL (Німеччина)

Методика від 01-2016
Версія 12.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

PLGF ELISA є імуноферментним аналізом для кількісного виміру плацентарного фактора зростання (PLGF) у сироватці людини. Він може бути використаний як діагностичний засіб для оцінки ймовірності прееклампсії у вагітних жінок. Подробиці можна знайти в розділі 7 "Очікувані нормальні значення".

1.2 РЕЗЮМЕ І ПОЯСНЕННЯ (Див. Оригінал інструкції англійською мовою).

2 ПРИНЦИП РОБОТИ ТЕСТУ

Набір PLGF ELISA являє собою твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), заснований на принципі сендвіча. Мікротитрувальні лунки покриті моноклональними антитілами, спрямованими проти унікального антигенного сайту молекули PLGF. Аліквоту зразка пацієнта, що містить ендогенний PLGF, інкубують в лунці. Після кроку промивання поліклональні антитіла, пов'язані з біотином, специфічні для PLGF, додають в лунки. Після промивання для видалення незв'язаного антитіла ферментний комплекс стрептавідин-HRP додають в лунки. Після інкубації непов'язаний ферментний комплекс вимивається. Кількість зв'язаної пероксидази пропорційна концентрації PLGF в зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації PLGF в зразку пацієнта

3. ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Тільки для використання в In-vitro діагностиці. Тільки для професійного використання.
2. Всі реагенти даного набору, що містять людську сироватку або плазму, були тестовані і знайдені негативними до ВІЛ 1/2, HbsAg та HCV, використовуючи встановлені процедури. Проте, поводитись з усіма реагентами як з потенційним джерелом інфекції.
3. Перед початком проведення тесту повністю і уважно прочитати інструкцію. Використовувати діючу версію інструкції, наданої з набором. Переконайтесь в тому, що все зрозуміло.
4. Планшет складається з відривних стрипів. Невикористані лунки необхідно зберігати при 2-8 °С запечатаними і використовувати з тримачем, який поставляється з набором.
5. Піпетування зразків і реагентів проводити якомога швидше і з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати резервуари тільки для одиночних реагентів. Це особливо стосується ємностей для субстрату. Використання резервуара для розчину субстрату, який використовувався для розчину кон'югату, може привести до фарбування розчину. Не повертати реагенти назад в пробірки, це може привести до забруднення.
7. Ретельно змішувати вміст лунок для отримання хороших результатів тесту. Не застосовувати мікролунки повторно.
8. Не допускати висихання лунок під час аналізу; додавати реагенти негайно після завершення кроків промивання.
9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °С) перед початком аналізу. Температура впливає на результати щільності аналізу. Тим не менш, це не вплине на результати аналізу пацієнтів.
10. Ніколи не піпетувати ротом і уникати контакту реагентів і зразків з шкірою та слизовими.
11. Не палити, не вживати їжу і напої, не використовувати косметику в місцях роботи зі зразками або реагентами набору.

12. Використовувати одноразові рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробне забруднення реагентів може привести до помилкових результатів.
13. Дотримуватись правил лабораторної практики та дотримуватись правил техніки безпеки.
14. Не використовувати прострочені реагенти.
15. Всі зазначені обсяги повинні дотримуватись. Оптимальні результати тесту будуть отримані тільки при використанні каліброваних піпеток і мікропланшетного рідера.
16. Не змішувати і не використовувати реагенти з різних партій. Рекомендується не змішувати лунки різних планшетів навіть з однієї партії. Набори могли транспортуватися або зберігатися при різних умовах і характеристики планшетів можуть відрізнятися.
17. Уникати контакту зі Стоп розчином, що містить 0.5M H₂SO₄. Це може викликати роздратування або опіки шкіри.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. У разі контакту з очима або шкірою негайно промити з великою кількістю води.
19. Субстрат ТМБ подразнює шкіру і слизові. У разі можливого контакту, промити очі водою і шкіру милом і водою. Вимити забруднені об'єкти перед їх повторним використанням. При вдиханні вийти на свіже повітря.
20. З хімікатами і приготованими або використаними реагентами поводитись як з небезпечними відходами відповідно до національних правил і біологічної безпеки.
21. Реагенти даного набору, що містять небезпечні матеріали, можуть викликати подразнення очей і шкіри. Дані щодо безпеки даного продукту доступні на веб-сторінці IBL або за запитом безпосередньо від IBL.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, що поставляються з набором

1. **Мікротитраційні лунки**, 12x8 (подільні), 96 лунок; Лунки покриті антитілом анти-PLGF (моноклональні).
2. **Нульовий Стандарт**, 1 флакон, 1 мл, готовий до використання;
Концентрація: 0 пг/мл
Містить консервант, який не містить ртуті.
3. **Стандарт (Стандарт 1-5)**, 5 флаконів, 1 мл, готові до використання;
Концентрації: 25; 50; 125; 500; 1000 пг/мл
Містить консервант, який не містить ртуті.
4. **Контроль Низький і Високий**, 2 флакони, 1 мл кожен, готові до використання;
Контрольні значення і діапазони вказані на етикетках або в листі Контролю якості.
Містить консервант, який не містить ртуті.
5. **Ферментний Кон'югат**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить біотинильовані козячі антитіла до людського PLGF.
Містить консервант, який не містить ртуті.
6. **Ферментний комплекс**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить кон'югат стрептавідин-пероксидаза, Містить консервант, який не містить ртуті.
7. **Робочий Буфер**, 1 флакон, 30 мл, готовий до використання, Містить консервант, який не містить ртуті.
8. **Промивний Розчин**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрований), див. "Підготовка реагентів".
9. **Розчин Субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМБ).
10. **Стоп Розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.5M H₂SO₄.
Уникати контакту зі Стоп-розчином. Може викликати подразнення шкіри і опіки.

Примітка: Додатковий 0 Стандарт для розведення зразків доступний під замовленням.

4.2 Необхідні, але не надані матеріали

- Калібрований зчитувач (450 ± 10 нм).
- Калібровані мікропіпетки різної точності.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Міліметровий папір або програмне забезпечення для обробки результатів.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °С в нерозпечатаній упаковці реагенти зберігають активність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після цієї дати. Відкриті реагенти повинні зберігатися при температурі 2-8 °С. Мікротитрувальні лунки повинні зберігатися при температурі 2-8 °С.

Як тільки упаковка була розкрита, слід подбати, щоб її знову щільно закрити. Відкриті набори зберігають активність протягом двох місяців при зберіганні, як описано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Привести всі реагенти і необхідну кількість смужок до кімнатної температури перед використанням.

Промивний Розчин

Додати деіонізованої води до Концентрату 40X Розчину для Промивання.

Розвести 30 мл концентрованого Розчину для Промивання з 1170 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл.

Розведений Промивний Розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізація набору повинна бути проведена відповідно до національних приписів компетентних служб. Спеціальна інформація для даного продукту наведена в паспорті з техніки безпеки.

4.6 Пошкоджені тестові набори

У разі серйозного пошкодження набору або його компонентів, виробник повинен бути поінформований в письмовій формі не пізніше одного тижня після отримання набору. Пошкоджені компоненти не повинні використовуватися для тестового запуску. Вони повинні бути збережені до прийняття остаточного рішення. Після цього вони повинні бути утилізовані відповідно до приписів компетентних служб.

5. ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

В даному аналізі повинна використовуватися сироватка.

Не застосовувати гемолітичні, іктеричні або ліпемічні зразки.

Зауваження: Не застосовувати зразки, що містять Na_2S_3 .

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Провести забір крові з вени (наприклад, Sarstedt Monovette для сироватки), дати їй згорнутися, відділити сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугувати до повного згортання. Пацієнтам, які проходять антикоагулянтну терапію, може знадобитися більше часу для згортання.

5.2 Зберігання і підготовка зразків

Зразки повинні бути закриті кришками і можуть зберігатися до 24 годин при температурі 2-8 °C до проведення аналізу.

Зразки, що зберігаються довше, слід заморозити тільки один раз при -20 °C до аналізу. Розморожені зразки повинні бути кілька разів перевернуті перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо в початковому аналізі зразок має концентрацію, що перевищує значення найвищого стандарту, зразок може бути розбавлений Робочим Буфером і проаналізований повторно.

Для обчислення концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

Приклад:

- а) розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл Робочого Буфера (ретельно перемішайте)
- б) розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл Робочого Буфера (ретельно перемішайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Всі реагенти і зразки повинні бути приведені до кімнатної температури перед використанням. Всі реагенти повинні бути перемішані без утворення піни.
- Після того як тест був запущений, всі кроки повинні бути завершені без перерви.
- Використовувати нові одноразові наконечники для піпеток для кожного стандарту, контролю або зразка щоб уникнути перехресного забруднення.
- Поглинання є функцією часу інкубації і температури. Перед початком аналізу рекомендується приготувати всі реагенти, зняти кришки, встановити лунки в тримачі і т.д. Це забезпечить однакові проміжки часу для кожного кроку піпетування.
- Як правило, ферментна реакція лінійно пропорційна часу і температурі.

6.2 Процедура тесту

Кожен прогін повинен включати стандартну криву.

Всі стандарти, зразки і контролю слід тестувати в дублікаті, і за умови, що всі умови тестування однакові.

1. Закріпити необхідну кількість лунок в тримачі.
2. Внести **25 мкл** кожного **Стандарту, Контролю і зразка новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки.
3. Додати **250 мкл Буфера для Аналізу** в кожну лунку.
4. Інкубувати **30 хвилин** при кімнатній температурі (планшет не накривати).
5. Різко вилити вміст лунок.
Промити лунки **3 рази** розведеним Промивним Розчином (400 мкл/лунку). Перевернути лунки на промокальний папір, щоб видалити залишки рідини.
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання!
6. Внести **100 мкл Ферментного Кон'югату** в кожну лунку.
7. Інкубувати **60 хвилин** при кімнатній температурі (планшет не накривати).
8. Вилити вміст лунок.
Промити лунки **3 рази** розведеним Промивним Розчином (400 мкл). Перевернути лунки на промокальний папір, щоб видалити залишки рідини.
9. Внести **100 мкл Ферментного Комплексу** в кожну лунку.
10. Інкубувати **30 хвилин** при кімнатній температурі.
11. Вилити вміст лунок.
Промити лунки **3 рази** розведеним Промивним Розчином (400 мкл). Перевернути лунки на промокальний папір, щоб видалити залишки рідини.
12. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожну лунку.
13. Інкубувати **30 хвилин** при кімнатній температурі.
14. Зупинити ферментативну реакцію додаванням **100 мкл Стоп Розчину** в кожну лунку.
15. Зчитати оптичну щільність при **450±10 нм** за допомогою мікропланшетного зчитувача **протягом 10 хвилин** після додавання **Стоп Розчину**.

6.3 Підрахунок результатів

1. Підрахувати середню абсорбцію для кожного набору стандартів, контролів і зразків пацієнтів.
2. Побудувати стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію, отриману для кожного стандарту, проти його концентрації зі значенням абсорбції на вертикальній (Y) осі і концентрацією на горизонтальній (X) осі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка визначити відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичний метод: Результати в IFU були розраховані автоматично за допомогою 4 PL (4-параметровий логістика) кривої. Інші методи обробки даних можуть давати дещо інші результати.
5. Концентрація зразків може бути зчитана безпосередньо зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж найвищий Стандарт, повинні бути додатково розбавлені або заявлені як > 1000 пг/мл. Для обчислення концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Пример типової Стандартної кривої

Наступні дані наведені тільки як приклад, і не можуть бути використані замість отриманих під час аналізу результатів.

Стандарт	Оптичні Одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 пг/мл)	0.06
Стандарт 1 (25 пг/мл)	0.18
Стандарт 2 (50 пг/мл)	0.28
Стандарт 3 (125 пг/мл)	0.59
Стандарт 4 (500 пг/мл)	1.63
Стандарт 5 (1000 пг/мл)	2.35

7. ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Кожній лабораторії рекомендується самостійно встановити свій власний діапазон нормальних значень.

Були протестовані зразки сироваток, взяті у практично здорових людей. Нижче наведені отримані значення:

Популяція	кількість	PLGF (пг/мл)
Дорослі не вагітні жінки	65	20.3 – 85.9
чоловіки	99	16.7 – 63.1

Концентрація PLGF при нормальній вагітності постійно підвищується, досягаючи піку з 28 по 32 тижні, а потім постійно знижується (5% - 95% процентиль).

При вагітності з гестозом медіана і нормальні значення значно знижені:

Популяція	Кількість	Медіана	5% - 95%
-----------	-----------	---------	----------

		PLGF (пг/мл)	процентиль PLGF (пг/мл)
Здорові вагітні жінки	59	207	33 – 918
Здорові вагітні жінки (27 - 32 тижень вагітності)	17	537.95	161 - 950
Вагітні жінки з гестозом	34	33.08	12 – 139
Вагітні жінки з гестозом (27 - 32 тижень вагітності)	13	77.14	13.97 - 268

Для оцінки ймовірності прееклампсії рекомендується визначати PLGF на 15-18 або 20-22 тижні вагітності.

Якщо концентрація PLGF в сироватці на 15-18 тижні вагітності <42 пг/мл і на 20-22 тижні вагітності <100 пг/мл, існує підвищена ймовірність розвитку прееклампсії при цій вагітності.

Самі по собі результати не повинні бути єдиною причиною для будь-яких терапевтичних наслідків. Результати повинні бути співвіднесені з іншими клінічними спостереженнями і діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних і місцевих нормативів. Використання контрольних зразків рекомендується для забезпечення достовірності результатів. Використовуйте контролю як нормальні, так і патологічні рівні.

Контролі і відповідні результати QC-лабораторії вказані в сертифікаті контролю якості, вкладеному в набір. Значення і діапазони, зазначені в листі QC, завжди відносяться до поточного лоту набору і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів.

Крім того, рекомендується використовувати національні та міжнародні програми оцінки якості для того, щоб забезпечити точність результатів.

Застосовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень і тенденцій. Якщо результати аналізу не співпадають з встановленими прийнятними діапазонами контрольних матеріалів, результат пацієнта вважається недійсним.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні параметри: прилади для піпетування; фотометр, терміни придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Після перевірки вказаних вище пунктів, не знаходячи жодної помилки, зверніться до свого дистриб'ютора або виробника безпосередньо.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться в межах 1.06 - 1000 пг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Спостерігалась перехресна реактивність менше 20% з rhVEGF/PLGF і менше 0.07% з rhFLT, mPLGF-2, rhPDGF і rhVEGF.

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість розраховувалася з середнього значення плюс два стандартних відхилення з двадцяти (20) повторних аналізів 0 Стандарту, і склала <1.062 пг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 В аналізі

Варіативність всередині аналізу наведена в таблиці нижче:

Зразок	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	10	50.5	2.8
2	10	478.6	1.7

9.4.2 Між аналізами

Варіативність між аналізами наведена в таблиці нижче:

Зразок	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	6	45.8	4.10
2	10	421.4	7.0

9.5 Відновлення

Зразки сироватки були збагачені розчинами PLGF з відомими концентраціями, в співвідношенні 1:1.

% відновлення був розрахований множенням співвідношення вимірної і очікуваної концентрацій на 100.

Зразок	Ендогенний PLGF, пг/мл	Доданий PLGF, (пг/мл)	Вимірний PLGF, (пг/мл)	Очікуваний PLGF, (пг/мл)	Відновлення (%)
1	21.28	0	21.28	21.28	100.0
		500	509.59	510.64	99.8
		250	226.72	260.64	87.0
		63	63.98	73.14	87.5
		25	32.17	35.64	90.3
2	41.97	0	41.97	41.97	100.0
		500	516.37	520.99	99.1

		250	283.89	270.99	104.8
		63	78.01	83.49	93.4
		25	40.63	45.99	88.4
3	444.18	0	444.18	444.18	100.0
		500	682.31	722.09	94.5
		250	458.57	472.09	97.1
		63	279.63	284.59	98.3
		25	260.68	247.09	105.5

9.6 Лінійність

Зразки сироватки були розведені 0 Стандартом.

Зразок	Розведення	Вимірня концентрація (пг/мл)	Очікувана концентрація (пг/мл)	Відновлення(%)
P2	Без розведення	28.47	28.47	100.0
	1:2	15.35	14.24	107.8
	1:4	7.82	7.12	109.9
	1:8	3.90	3.56	109.7
	1:16	2.00	1.78	112.6
P4	Без розведення	49.73	49.73	100.0
	1:2	21.89	24.86	88.1
	1:4	13.32	12.43	107.2
	1:8	6.95	6.22	111.9
	1:16	3.47	3.11	111.6
P5	Без розведення	479.10	479.10	100.0
	1:2	259.93	239.55	108.5
	1:4	122.22	119.77	102.0
	1:8	64.49	59.89	107.7
	1:16	32.89	29.94	109.8

9.7 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначалася як ймовірність отримати негативний результат за допомогою даного методу без спеціального аналізу.

На 15-18 тижні вагітності вона склала 0.83.

9.8 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначалася як ймовірність отримати позитивний результат за допомогою даного методу в присутності специфічного аналізу.

На 15-18 тижні вагітності вона склала 0.87.

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані при проведенні аналізу з повним розумінням інструкції і з дотриманням правил належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація цього тесту можуть вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), Білірубін (до 0.5 мг/мл) не впливають на результати аналізу. Тригліцериди з концентрацією до 1.9 мг/мл і вище можуть впливати на результати тестування.

10.2 вплив лікарських засобів

На сьогоднішній день немає речовин (лікарських засобів), нам відомих, які впливають на вимірювання PLGF в зразку.

10.3 Хук-ефект високої дози

Хук-ефект високої дози не спостерігався в цьому аналізі до 250000 пг/мл.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Тест повинен проводитися точно відповідно до інструкцій виробника щодо застосування. Крім того, користувач повинен строго дотримуватися правил GLP (Good Laboratory Practice) або інших застосованих національних стандартів та/або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Завжди важливо включати, в межах процедури випробування, достатню кількість контролів для перевірки достовірності та точності тесту.

Результати випробувань дійсні, тільки, якщо всі Контролі знаходяться в межах зазначених діапазонів і, якщо всі інші параметри випробування також в межах, зазначених у специфікації аналізу. У разі будь-яких сумнівів або занепокоєння, зверніться до виробника.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки ніколи не повинні бути засновані тільки на результатах лабораторних аналізів, навіть якщо всі результати випробувань знаходяться відповідно до пунктів як зазначено в 11.1. Будь-який лабораторний результат лише частина від загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки в тих випадках, коли результати лабораторних досліджень знаходяться в прийнятному узгодженні із загальною клінічною картиною пацієнта, можна робити терапевтичні висновки.

Сам результат тесту не повинен бути єдиним фактором, що є визначальним для отримання будь-якого терапевтичного висновку.

11.3 Відповідальність

Будь-яка зміна в тестовому наборі і/або обмін або перемішування всіх компонентів з різних партій одного тесту набору на інший може негативно вплинути на передбачувані результати і достовірність тесту в цілому. Така модифікація і/або обмін анулюють претензії на заміну.

Претензії, пред'явлені у зв'язку з клієнтською неправильною інтерпретацією результатів лабораторних досліджень, також недійсні. Незважаючи на це, в разі будь-яких претензій, відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Будь-яка шкода, заподіяна тестовому набору при транспортуванні, не підлягає відповідальності виробника.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com