

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ БЕЛКА ПЛАЗМЫ А (ПАББ-А) В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ПАББ-А-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ПАББ-А-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации ассоциированного с беременностью белка плазмы А (ПАББ-А) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) или ассоциированный с беременностью белок плазмы А (АББПА, ПАББ-А) представляет собой гликопротеин, состоящий из двух субъединиц. При нормально протекающей беременности концентрация ПАББ-А в материнском кровотоке возрастает в течение первых двух триместров беременности. Функциональное назначение ПАББ-А во время беременности остается невыясненным. В первом триместре беременности при синдроме Дауна у плода наблюдается снижение уровня ПАББ-А в сыворотке крови матери. После 14-й недели беременности различия между синдромом Дауна и нормой исчезают. Измерение ПАББ-А может быть использовано в пренатальном скрининге беременности высокого риска. Определение ПАББ-А в первом триместре входит в состав одной из комбинаций тестов:

- ПАББ-А + свободная бета-цепь ХГЧ;
- ПАББ-А + свободная бета-цепь ХГЧ + толщина воротникового пространства при УЗИ плода.

Вне беременности и у мужчин сывороточный уровень ПАББ-А в норме крайне низкий и обычно находится ниже чувствительности методом иммуноанализа; в последнее время появляются указания на связь повышения уровня ПАББ-А с повышенным риском осложнений ишемической болезни сердца.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование мышинных моноклональных антител к ПАББ-А позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ПАББ-А в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ПАББ-А-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации ПАББ-А в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ПАББ-А, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 40-10000 МЕд/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ПАББ-А предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 150 МЕд/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ПАББ-А-ИФА» концентрация ПАББ-А в сыворотке (плазме) крови не превышает 20 МЕд/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P238Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C238Z	CAL 1-6	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества ассоциированного с беременностью белка плазмы А (ПАББ-А) – 0; 40; 150; 600; 2500; 10000 МЕА/л , готовы к использованию (по 0.6 мл каждая)	6	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q238Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ассоциированного с беременностью белка плазмы А (ПАББ-А), готова к использованию (0.6 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T238Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
5 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9 K238I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «ПАББ-А-ИФА»	1	шт.	-
10 K238Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ПАББ-А-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

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 $+37 \pm 0,1$ °C;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

7.2. 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 $+2-8$ °C в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ПАББ-А-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. 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;
- конъюгат, субстрат, 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 не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2-8 °С не более 30 суток;

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

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

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

8.6. 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 ассоциированного с беременностью белка плазмы А (ПАББ-А) в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 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 раствора субстрата тетраметилбензида. Внесение раствора субстрата тетраметилбензида 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 тетраметилбензида, 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 ПАББ-А в калибровочных пробах (мЕд/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обседа (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
10	Определите по калибровочному графику содержание ПАББ-А в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

Приведенные ниже медианы получены на основе анализа 1840 сывороток крови беременных женщин – жительниц Санкт-Петербурга и Ленинградской области – в НИИ акушерства и гинекологии им. Отта с помощью данного набора.

Приведенные в таблице значения имеют рекомендательный характер и могут использоваться для расчета риска синдрома Дауна только на этапе накопления собственных медиан в каждой лаборатории.

Значения медиан могут отличаться в различных географических зонах ввиду расовых и популяционных особенностей.

В соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

По мере накопления новых данных о медианах данные будут уточняться – высылайте запросы на адрес rqc@xeta.ru

Для расчета риска синдрома Дауна с учетом данных других параметров первого триместра рекомендуется использовать программу КРСД-ХЕМА.

Примечание. Значения концентраций ПАББ-А в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (20 мЕд/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (10000 мЕд/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация ПАББ-А ниже 20 мЕд/л или выше 10000 мЕд/л.

В Наборе «ПАББ-А-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в мЕд/л. Для пересчета концентраций в мкг/мл, полученное значение концентрации в мЕд/л следует умножить на 0.0045.

$$1 \text{ мЕд/л} = 0.0045 \text{ мкг/мл}$$

Исследуемая группа	Единицы		Единицы доп.	
	мЕд/л		мкг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	-	150	-	0.68
Женщины	-	150	-	0.68

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

Беременные, неделя	Медиана, мЕд/л	СКО
9 неделя	969	2.9
10 неделя	1279	3.3
11 неделя	2153	3.4
12 неделя	3205	3.4
13 неделя	4250	3.6

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Schaelike M, Kossakiewicz M, Kossakiewicz A, Schild RL Examination of a first-trimester Down syndrome screening concept on a mix of 11,107 high- and low-risk patients at a private center for prenatal medicine in Germany. // *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 May;33(5):518-23
2. Wortelboer EJ, Koster MP, Stoutenbeek P, Elvers LH, Loeber JG, Visser GH, Schielen PC. First-trimester Down syndrome screening performance in the Dutch population; how to achieve further improvement? // *Prenat Diagn.* 2009 Mar 17. [Epub ahead of print]
3. Linskens IH, Levitus M, Frans A, Schielen PC, van Vugt JM, Blankenstein MA, Dijkstra HM. Performance of free beta-human chorionic gonadotrophin (free beta-hCG) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) analysis between Delfia Xpress and AutoDelfia systems in The Netherlands. // *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):222-6
4. Schmidt P, Staboulidou I, Soergel P, Wüstemann M, Hillemanns P, Scharf A. Comparison of Nicolaides' risk evaluation for Down's syndrome with a novel software: an analysis of 1,463 cases. // *Arch Gynecol Obstet.* 2007 Jun;275(6):469-74. Epub 2007 Mar 1
5. Spencer K. Accuracy of Down's syndrome risks produced in a prenatal screening program. // *Ann Clin Biochem.* 1999 Jan;36 (Pt 1):101-3.

По вопросам, касающимся качества Набора «**ПАББ-А-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: info@xema.ru; rqc@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 PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN
A IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA**

1. INTENDED USE

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

This kit is designed for measurement of pregnancy-associated plasma protein A 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

PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) is a high molecular weight glycoprotein consisting of two subunits. In normal pregnancy, PAPP-A level in maternal blood increases during the first two trimesters. Functional significance of PAPP-A during pregnancy remains unclear.

Lowered levels of PAPP-A are observed in Down's syndrome (trisomy 21) during weeks 8-12; after week 14, PAPP-A levels become similar to those in normal pregnancies. Low PAPP-A levels are also found in other trisomies (18 and 13) and chromosomal abnormalities in the fetus and in complicated pregnancies.

Determination of PAPP-A level in the first trimester is used in the following combinations of tests:

1. PAPP-A + free beta-HCG
2. PAPP-A + free beta-HCG + USI of nuchal translucency

In men and non-pregnant women, PAPP-A level is extremely low – usually, it is below the sensitivity level of most immunoassays. Recently, some evidence has appeared to confirm a link between raised PAPP-A levels and increased risk of complications in patients with coronary disease.

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 human PAPP-A-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to human PAPP-A, 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% H₂SO₄. 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. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The 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	SORB MTP PAPP-A EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2	CAL 1 – 6 Calibrator set, 0.6 ml each. The set contains 6 calibrators: 0; 40; 150; 600; 2500; 10000 mU/l	6	pcs	blue (C1 – colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (0.6 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml	1	pcs	blue	until exp. date
5	SUBS TMB Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp. date Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT
7	STOP Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
8	N003 Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	K2381 Instruction PAPP-A EIA	1	pcs		N/A
10	K238Q QC data sheet PAPP-A 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 to 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 to +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 21X by 21 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 mU/l = 0.0045 µg/ml

7.5. 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	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
3	Pipet 10 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).
4	Incubate 60 minutes at 37 °C.
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
6	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells.
7	Incubate 10-20 minutes at 18-25 °C.
8	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
9	Measure OD (optical density) at 450 nm.
10	Set photometer blank on first calibrator.
11	Apply lin-log method for data reduction.

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

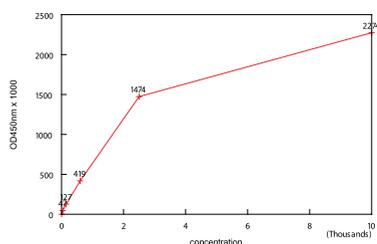
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus pregnancy-associated plasma protein A concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of pregnancy-associated plasma protein A 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 mU/l	0.07
CAL 2	40 mU/l	0.12
CAL 3	150 mU/l	0.20
CAL 4	600 mU/l	0.49
CAL 5	2500 mU/l	1.55
CAL 6	10000 mU/l	2.35



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 PAPP-A. 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		Units alternative	
	mU/l		µg/ml	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
Males	-	150	-	0.68
Females	-	150	-	0.68

Pregnancy, week	Median, mU/l	SKO
9	969	2.9
10	1279	3.3
11	2153	3.4
12	3205	3.4
13	4250	3.6

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity.

The monoclonal antibody is specific for human PAPP-A. There is no cross-reactivity to other species

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 20 mU/l.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different pregnancy-associated plasma protein A concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known pregnancy-associated plasma protein A concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

- Schaelike M, Kossakiewicz M, Kossakiewicz A, Schild RL Examination of a first-trimester Down syndrome screening concept on a mix of 11,107 high- and low-risk patients at a private center for prenatal medicine in Germany. // *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 May;33(5):518-23
- Wortelboer EJ, Koster MP, Stoutenbeek P, Elvers LH, Loeber JG, Visser GH, Schielen PC. First-trimester Down syndrome screening performance in the Dutch population; how to achieve further improvement? // *Prenat Diagn.* 2009 Mar 17. [Epub ahead of print]
- Linskens IH, Levitus M, Frans A, Schielen PC, van Vugt JM, Blankenstein MA, Dijkstra Bloem HM. Performance of free beta-human chorionic gonadotrophin (free beta-hCG) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) analysis between Delfia Xpress and AutoDelfia systems in The Netherlands. // *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):222-6
- Schmidt P, Staboulidou I, Soergel P, Wüstemann M, Hillemanns P, Scharf A. Comparison of Nicolaides' risk evaluation for Down's syndrome with a novel software: an analysis of 1,463 cases. // *Arch Gynecol Obstet.* 2007 Jun;275(6):469-74. Epub 2007 Mar 1
- Spencer K. Accuracy of Down's syndrome risks produced in a prenatal screening program. // *Ann Clin Biochem.* 1999 Jan;36 (Pt 1):101-3.