

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛАЦЕНТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА (PLGF) В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

## RE52361, PLGF ELISA

Каталог. № : **RE52361**  
Количество : **96**  
Производитель: **IBL (Германия)**

Методика от **09-2011**  
Версия **11.0**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Иммуноферментный анализ для количественного определения Плацентарного фактора роста (PLGF) человека в сыворотке. Только для использования в In-vitro диагностике.

**1.2 РЕЗЮМЕ И ПОЯСНЕНИЯ** (См. Оригинал инструкции на английском языке)

### 2 ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Данный метод PLGF ELISA основан на «сэндвич» иммуноферментном анализе и предназначен для количественного определения PLGF в образцах сыворотки.

Лунки микропланшета покрыты антителами к уникальному антигенному сайту молекулы PLGF. Образцы сывороток пациентов, содержащие эндогенный PLGF, инкубируют в лунках микропланшета.

После промывки в лунки вносят поликлональные антитела к PLGF, конъюгированные с биотином. После инкубации и промывки удаляют несвязавшиеся антитела, и в лунки вносят конъюгат стрептавидин-HRP. После инкубации и промывки удаляют несвязавшийся стрептавидин-HRP. Количество связавшейся пероксидазы пропорционально концентрации PLGF в образце.

После внесения субстратного раствора развивающееся окрашивание пропорционально концентрации PLGF в образце.

### 3. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для использования в In-vitro диагностике. Только для профессионального использования.
2. Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были протестированы и найдены отрицательными к ВИЧ 1/2, HbsAg и HCV, используя установленные процедуры. Тем не менее, обращаться со всеми реагентами как с потенциальным источником инфекции.
3. Перед началом проведения теста полностью и внимательно прочитать инструкцию. Использовать действующую версию инструкции, предоставленной с набором. Убедиться в том, что все понятно.
4. Планшет состоит из отрываемых стрипов. Неиспользованные лунки необходимо хранить при 2-8 °C запечатанными и использовать с поставляемым держателем.
5. Пипетирование образцов и реагентов проводить как можно быстрее и с одинаковыми интервалами для каждого шага.
6. Использовать резервуары только для одиночных реагентов. Это особенно касается емкостей для субстрата. Использование резервуара для раствора субстрата, который использовался для раствора конъюгата, может привести к окрашиванию раствора. Не возвращать реагенты обратно в пробирки, это может привести к загрязнению.
7. Тщательно смешивать содержимое лунок для получения хороших результатов теста. Не использовать микролунки повторно.
8. Не допускать высыхания лунок во время анализа; добавлять реагенты немедленно после завершения шагов промывки.
9. Позволить реагентам достичь комнатной температуры (21-26 °C) перед началом анализа. Температура влияет на результаты плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты анализа пациентов.
10. Никогда не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Не курить, не употреблять пищу и напитки, не наносить косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.

12. Использовать одноразовые перчатки при работе с образцами и реагентами. Микробное загрязнение реагентов может привести к ложным результатам.
13. Следовать правилам лабораторной практики и соблюдать правила техники безопасности.
14. Не использовать просроченные реагенты.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться. Оптимальные результаты теста будут получены только при использовании калиброванных пипеток и микропланшетных ридеров.
16. Не смешивать и не использовать реагенты из разных партий. Рекомендуется не перемешивать лунки разных планшетов даже из одной партии. Наборы могли транспортироваться или храниться при разных условиях и связывающие характеристики планшетов могут отличаться.
17. Избегать контакта со *Стоп раствором*, содержащим 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Это может вызвать раздражение или ожоги кожи.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, BND и/или MIT в качестве консервантов. В случае контакта с глазами или кожей немедленно промыть с большим количеством воды.
19. Субстрат ТМБ оказывает раздражающее действие на кожу и слизистые. В случае возможного контакта, промыть глаза водой и кожу мылом и водой. Вымыть загрязненные объекты перед их повторным использованием. При вдыхании выйти на свежий воздух.
20. С химикатами и приготовленными или использованными реагентами обращаться как с опасными отходами в соответствии с национальными правилами по биологической безопасности.
21. Реагенты данного набора, содержащие опасные материалы, могут вызвать раздражение глаз и кожи. За деталями обратиться к разделу ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ и этикеткам. Данные по безопасности данного продукта доступны на веб-странице IBL или по запросу непосредственно от IBL.

### 4. РЕАГЕНТЫ

#### 4.1 Поставляемые материалы

1. **Микротитрационные лунки**, 12x8 (делимые), 96 лунок; Лунки покрыты антителом анти-PLGF (моноклональным).
2. **Нулевой Стандарт**, 1 флакон, 1 мл, готов к использованию; Концентрация: 0 пг/мл  
Содержит консервант, не содержащий ртути.
3. **Стандарт (Стандарт 1-5)**, 5 флаконов, 1 мл, готов к использованию; Концентрации: 25; 50; 125; 500; 1000 пг/мл  
Содержит консервант, не содержащий ртути.
4. **Контроль Низкий и Высокий**, 2 флакона, 1 мл каждый, готов к использованию; Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетках или в листе Контроля качества.  
Содержит консервант, не содержащий ртути.
5. **Ферментный Конъюгат**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит биотинилированные козы антитела к человеческому PLGF  
Содержит консервант, не содержащий ртути.
6. **Ферментный комплекс**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит конъюгат стрептавидин-пероксидаза,  
Содержит консервант, не содержащий ртути.
7. **Рабочий Буфер**, 1 флакон, 30 мл, готов к использованию,  
Содержит консервант, не содержащий ртути.
8. **Промывочный Раствор**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрированный), см. "Подготовка реагентов".
9. **Раствор Субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
10. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Избегать контакта со Стоп раствором. Может вызвать раздражения кожи и ожоги.

**Примечание:** Дополнительный 0 Стандарт для разбавления образцов доступен под заказ.

#### 4.2 Требуемые, но не поставляемые материалы

- Считывающее устройство пластины микротитратора (450 ± 10 нм).
- Калиброванные микропипетки различной точности.
- Впитывающая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов.

#### 4.3 Условия хранения

При хранении при температуре 2-8 °С в нераспечатанной упаковке реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не используйте реагенты после этой даты.

Открытые реагенты должны храниться при температуре 2-8 °С. Микротитровальные лунки должны храниться при температуре 2-8 °С. Как только упаковка была вскрыта, следует позаботиться, чтобы ее снова плотно закрыть. Открытые наборы сохраняют активность в течение двух месяцев при хранении, как описано выше.

#### 4.4 Подготовка реагентов

Привести все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре перед использованием.

#### Промывочный Раствор

Добавить деионизированной воды к 40X Концентрату Промывочного Раствора.

Развести 30 мл концентрированного *Промывочного Раствора* со 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

*Разведенный Промывочный Раствор стабилен в течение 2 недель при комнатной температуре.*

#### 4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна быть проведена в соответствии с национальными предписаниями компетентных служб. Специальная информация для данного продукта приведена в паспорте по технике безопасности.

#### 4.6 Поврежденные тестовые наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, производитель должен быть информирован в письменной форме не позднее одной недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться для тестового запуска. Они должны быть сохранены до принятия окончательного решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с предписаниями компетентных служб.

### 5. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

В данном анализе может использоваться сыворотка.

Не использовать гемолитические, иктерические или липемические образцы.

Замечание: Не использовать образцы, содержащие  $\text{NaN}_3$ .

#### 5.1 Забор образцов

##### Сыворотка:

Провести забор крови из вены (например, Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Пациентам, проходящим антикоагулянтную терапию, может потребоваться больше времени для свертывания.

#### 5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрыты крышками и могут храниться до 24 часов при температуре 2-8 °С до проведения анализа.

Образцы, предназначенные для более длительного времени (до двух месяцев), следует заморозить только один раз при -20 °С до анализа. Размороженные образцы должны быть несколько раз перевернуты перед тестированием.

#### 5.3. Разведение образцов

Если в изначальном анализе образец имеет концентрацию, превышающую значение наивысшего Стандарта, образец может быть разбавлен 0 *Стандартом* и проанализирован повторно.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

##### Пример:

- разведение 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл 0 *Стандарта* (тщательно перемешайте)
- разведение 1:100: 10 мкл разведения а) 1:10 + 90 мкл 0 *Стандарта* (тщательно перемешайте).

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть приведены к комнатной температуре перед использованием. Все реагенты должны быть перемешаны без образования пены.
- После того как тест был запущен, все шаги должны быть завершены без перерыва.
- Использовать новые одноразовые наконечники для пипеток для каждого стандарта, контроля или образца во избежание перекрестного загрязнения.
- Поглощение является функцией времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в

держателе и т.д. Это обеспечит одинаковые промежутки времени для каждого шага пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

#### 6.2 Процедура теста

Каждый прогон должен включать стандартную кривую.

Все стандарты, образцы и контроли следует тестировать в дубликаты, и при условии, что все условия тестирования одинаковы.

1. Закрепить необходимое количество лунок в держателе.
2. Внести **25 мкл** каждого **Стандарта, Контроля и образца новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки.
3. Добавить **250 мкл Буфера для анализа** в каждую лунку. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. Очень важно полное смешивание в этом шаге.
4. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (планшет не накрывать).
5. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **3 раза** разведенным *Промывочным раствором* (400 мкл/лунку). Ударить лунками резко по салфетке, чтобы удалить оставшиеся капли.  
**Важное примечание:** Чувствительность и точность этого анализа зависят от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Внести **100 мкл** разведенного **Ферментного конъюгата** (см. "Подготовка реагентов") в каждую лунку.
7. Инкубировать **60 минут** при комнатной температуре (планшет не накрывать).
8. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **3 раза** разведенным *Промывочным раствором* (400 мкл). Ударить лунками резко по салфетке, чтобы удалить оставшиеся капли.
9. Добавить **100 мкл Раствора субстрата** в каждую лунку.
10. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
11. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **3 раза** разведенным *Промывочным раствором* (400 мкл). Ударить лунками резко по салфетке, чтобы удалить оставшиеся капли.
12. Внести **100 мкл Субстратного раствора** в каждую лунку.
13. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
14. Остановить ферментативную реакцию добавлением **100 мкл Стоп раствора** в каждую лунку.
15. Считать оптическую плотность при **450±10 нм** при помощи микропланшетного считывателя **в течение 10 минут** после добавления *Стоп раствора*.

#### 6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациентов.
2. Построить стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта, против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрацией на горизонтальной (X) оси.
3. Используя среднее значение абсорбции для каждого образца определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматический метод: Результаты в IFU были рассчитаны автоматически с помощью 4 PL (4-параметровая логистика) кривой. Другие методы обработки данных могут давать несколько отличающиеся результаты.
5. Концентрация образцов может быть считана непосредственно со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем самый высокий Стандарт, должны быть дополнительно разбавлены или заявлены как > 1000 пг/мл. Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

##### 6.3.1 Пример типичной Стандартной Кривой

Следующие данные приведены только в качестве примера, и не могут быть использованы вместо полученных во время анализа результатов.

Стандарт	Оптические Единицы (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. ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить свой собственный диапазон нормальных значений.

Были протестированы образцы сывороток, взятые у практически здоровых людей. Ниже приведены полученные значения:

Популяция	Кол-во	PLGF (пг/мл)
Взрослые не беременные женщины	65	20.3 – 85.9
Мужчины	99	16.7 – 63.1

Концентрация PLGF при нормальной беременности постоянно повышается, достигая пика с 28 по 32 недели, а затем постоянно снижается (5% - 95% процентиль).

При беременности с гестозом медиана и нормальные значения значительно снижены:

Популяция	Кол-во	Медиана PLGF (пг/мл)	5% - 95% процентиль PLGF (пг/мл)
Здоровые беременные женщины	59	207	33 – 918
Здоровые беременные женщины (27 – 32 неделя беременности)	17	537.95	161 – 950
Беременные женщины с гестозом	34	33.08	12 – 139
Беременные женщины с гестозом (27 – 32 неделя беременности)	13	77.14	13.97 – 268

Для оценки вероятности преэклампсии рекомендуется определять PLGF на 15-18 или 20-22 неделе беременности. Если концентрация PLGF в сыворотке на 15-18 неделе беременности < 42 пг/мл и на 20-22 неделе беременности < 100 пг/мл, существует повышенная вероятность развития преэклампсии при этой беременности.

## 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечить повседневной достоверности результатов. Используйте контроли как нормальных, так и патологических уровней.

Контроли и соответствующие результаты QC-лаборатории указаны в сертификате контроля качества, вложенном в набор. Значения и диапазоны, указанные в листе QC всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Кроме того, рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.

Применяйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не сходятся с установленными приемлемыми диапазонами контрольных материалов, результат пациента считается недействительным.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические направления: приборы для пипетирования; фотометр, сроки годности реагентов, условия его хранения и инкубации, методы аспирации и промывки.

После проверки указанных выше пунктов, не находя никакой ошибки обратитесь к своему дистрибьютору или производителю напрямую.

## 9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 1.06 - 1000 пг/мл.

### 9.2 Специфичность антител (Перекрестная реактивность)

Показана перекрестная реактивность менее 20% с rhVEGF/PLGF и менее 0.07% с rhFLT, mPLGF-2, rhPDGF и rhVEGF.

### 9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность рассчитывалась из среднего значения плюс два стандартных отклонения из двадцати (20) повторных анализов 0 Стандарта, и составила < 1.062 пг/мл.

### 9.4 Воспроизводимость

#### 9.4.1 Вариации внутри анализа

Вариативность внутри анализа приведена в таблице ниже:

Образец	n	Среднее (пг/мл)	CV (%)
1	10	50.5	2.8
2	10	478.6	1.7

#### 9.4.2 Вариации между анализами

Вариативность между анализами приведена в таблице ниже:

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

## 9.5 Восстановление

Образцы сыворотки были обогащены растворами PLGF с известными концентрациями, в соотношении 1:1.

% извлечения был рассчитан умножением отношения измеренной и ожидаемой концентраций на 100.

Образец	Эндогенный PLGF, пг/мл	Добавленный PLGF, (пг/мл)	Измеренный PLGF, (пг/мл)	Ожидаемый PLGF, (пг/мл)	Восстановление (%)
1	21.28	0	21.28	510.64	99.8
		500	509.59	260.64	87.0
		250	226.72	73.14	87.5
		63	63.98	35.64	90.3
2	41.97	0	41.97	520.99	99.1
		500	516.37	270.99	104.8
		250	283.89	83.49	93.4
		63	78.01	45.99	88.4
3	444.18	0	444.18	722.09	94.5
		500	682.31	472.09	97.1
		250	458.57	284.59	98.3
		63	279.63	247.09	105.5

## 9.6 Линейность

Образцы сыворотки были разведены нулевым стандартом.

Образец	Разведение	Измеренная концентрация (пг/мл)	Ожидаемая концентрация (пг/мл)	Восстановление (%)
P2	Без разведения	28.47	28.47	
	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 разведения	49.73	49.73	
	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 разведения	479.10	479.10	
	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 Диагностическая специфичность

Диагностическая определялась как вероятность получить отрицательный результат с помощью данного метода в отсутствие специфического анализата.

На 15-18 неделе беременности она составила 0.83.

## 9.8 Диагностическая чувствительность

Диагностическая определялась как вероятность получить положительный результат с помощью данного метода в присутствии специфического анализата.

На 15-18 неделе беременности она составила 0.87.

## 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены при проведении анализа с полным пониманием инструкции и с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого теста могут повлиять на результаты.

### 10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), Билирубин (до 0.5 мг/мл) не влияют на результаты анализа. Триглицериды с концентрацией до 1.9 мг/мл и выше могут влиять на результаты тестирования.

### 10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня нет веществ (лекарственных средств), нам известных, которые оказывают влияние на измерения PLGF в образце.

### 10.3 Хук-эффект высокой дозы

Хук-эффект высокой дозы не наблюдался в этом тесте до 250000 пг/мл.

## 11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

### 11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться точно в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен

строго придерживаться правил GLP (Good Laboratory Practice) или других применимых национальных стандартов и/или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Всегда важно включать, в пределах процедуры испытания, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты испытаний действительны, только, если все Контроли находятся в пределах указанных диапазонов и, если все другие параметры испытания также в пределах, указанных в спецификации анализа. В случае каких-либо сомнений или беспокойства обращайтесь к изготовителю.

### **11.2 Терапевтические последствия**

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если все результаты испытаний находятся в соответствии с пунктами как указано в 11.1. Любой лабораторный результат лишь часть от общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований находятся в приемлемом согласии с общей клинической картиной пациента, можно делать терапевтические заключения.

Сам результат теста не должен быть единственным фактором, являющимся определяющим для получения любого терапевтического заключения.

### **11.3 Ответственность**

Любое изменение в тестовом наборе и/или обмен или перемешивание любых компонентов из разных партий одного теста набора на другой может негативно повлиять на предполагаемые результаты и достоверность теста в целом. Такая модификация и/или обмен аннулируют претензии на замену.

Претензии, предъявленные в связи с клиентской неправильной интерпретацией результатов лабораторных исследований, также недействительны. Несмотря на это, в случае любых претензий, ответственность производителя не должна превышать стоимость тестового набора. Любой ущерб, причиненный тестовому набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.



#### **ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)