

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення асоційованого з вагітністю протеїну плазми - А (РАРР-А-БЕСТ)

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «РАРР-А-БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації асоційованого з вагітністю протеїну плазми - А у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «РАРР-А-БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

2. СКЛАД НАБОРУ

Планшет - полістирольний, з іммобілізованими антитілами до РАРР-А **1 упаковка.**

Кон'югат (x10) – анти - РАРР-А – пероксидаза, 1,5 мл **1 флакон**

РРК (розчин для розведення конюгату), 14 мл **1 флакон**

Калібрувальні проби (КП) ліофілізовані: **комплект**

КП№1- 1 флакон, 0,15 мл, містить 0 мкг/мл РАРР-А,

КП№2- 1 флакон, 0,15 мл, містить 1 мкг/мл РАРР-А,

КП№3- 1 флакон, 0,15 мл, містить 2,5 мкг/мл РАРР-А,

КП№4- 1 флакон, 0,15 мл, містить 5,0 мкг/мл РАРР-А,

КП№5- 1 флакон, 0,15 мл, містить 15,0 мкг/мл РАРР-А,

КП№6- 1 флакон 0,15 мл, містить 30,0 мкг/мл РАРР-А,

примітка: точні номінали каліброваних проб зазначені на етикетках флаконів і в паспорті до набору реагентів.

КС низький рівень (контрольна сироватка, ліофілізована) містить відому кількість РАРР-А, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону. **1 флакон**

КС високий рівень (контрольна сироватка, ліофілізована) містить відому кількість РАРР-А, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону. **1 флакон**

РРС (Розчин для розведення зразків сироватки крові), водно-сольовий розчин, 25 мл **1 флакон**

Промиваючий розчин (x40), концентрований водно-сольовий розчин для промивання, 30 мл **1 флакон**

ТМБ (Розчин тетраметилбензидина), 14 мл **1 флакон**

Стоп-реагент, 14 мл **1 флакон**

Коефіцієнт перерахунку: 1 МОд/мл = 4.5 мг/л

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість. Мінімальна достовірно обумовлена набором концентрація РАРР-А в сироватці крові людини не перевищує 0,150 мкг / мл.

3.2. Діапазон очікуваних значень.

Значення медіани, розраховується для кожного терміну вагітності, залежить від багатьох факторів: специфічності метода, особливостей досліджуваної популяції, точності метода в конкретній лабораторії. Для цього кожній лабораторії рекомендується використовувати данні виробником значення медіан тільки до тих пір, поки спеціалістами лабораторії не будуть визначенні медіани, характерні для конкретної популяції в місці розташування.

Вагітні – 1 триместр:

Враховують вагу та термін вагітності в такому рівнянні

Медіана (вага) РАРР-А = EXP (-2.12268 + 0.06324 x термін вагітності (день) – 0.00979 x вага).

Якщо тільки термін вагітності (без ваги), то отримують наступне рівняння :

Медіана (б/в) РАРР-А = EXP (-2.705444 + 0.0618725 x термін вагітності (день)).

Термін вагітності (повних тижнів)	день вагітності	Медіана (б/в) [мкг/мл] без ваги	Медіана (вага) [мкг/мл] вага 50 кг	Медіана (вага) [мкг/мл] вага 65 кг	Медіана (вага) [мкг/мл] вага 100 кг	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

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не пікетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Одно- Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

6.1. Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для венозної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку.

6.2. Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

6.3. Зразки сироватки крові слід використати протягом 24 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...+8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче -20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ.

7.1. Підготовка реагентів

7.1.1 . Стріпи . Перед розкриттям пакет зі стріпами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стріпів .

7.1.2 . Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів легким постукуванням струсити частинки , які прилипли до стінок флаконів або до кришок . Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальної проб і контрольної сироваткою внести по 150 мкл дистильованої води і закрити кришками.

Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) без перемішування . Потім , акуратно нахилиючи і обертаючи флакони , перемішати їх вміст до повного розчинення , уникаючи піноутворення . Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі , періодично перемішуючи.

7.1.3 .Розчин кон'югату. До 1 мл кон'югату додати 10 мл РПК. 7.1.4 . РРС готовий до використання.

7.1.5 . Розчин для промивання . Необхідна кількість промивочного розчину розвести дистильованою водою в 40 разів. Наприклад:

5 мл промивочного розчину + 195 мл дистильованої води

Ретельно перемішати , уникаючи піноутворення .

7.1.6 . Розчин тетраметілбензідіна (ТМБ) готовий до використанню .

7.1.7 . Стоп - реагент готовий до використання.

7.1.8 . Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури.

7.2 . Постановка аналізу

7.2.1 . Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином :

A1 , A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ ;

B1 , B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1;

C1 , C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2;

D1 , D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3;

E1 , E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4 ;

F1 , F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5;

G1 , G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6 ;

H1 , H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини контрольних сироваток

7.2.2 . Внести у відповідні лунки по 10 мкл калібрувальних проб та контрольних сироваток , в що залишилися лунки - по 10 мкл досліджуваної сироватки в дублях.

7.2.3. Додати по 100 мкл РРС. Ретельно перемішати.

Примітка: загальний час внесення калібрувальних проб , контрольної сироватки і досліджуваних сироваток крові не повинен перевищувати 15 хвилин , інакше час інкубації різних зразків буде значно відрізнятись , що призведе до неправильних результатів .

7.2.4. Інкубувати стріпи протягом 30 хвилин при кімнатній температурі +18 - +25 ° С.

7.2.5. По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки 3 рази. При кожній промивці в усі лунки додати по 400 мкл розчину для промивання ,приготованого за п. 7.1.5 , струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з наступним декантуванням . Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу .

Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивання пристрою.

7.2.6. Внести в лунки по 100 мкл розчину кон'югату. Ретельно перемішати.

Інкубувати стріпи протягом 30 хвилин при кімнатній температурі +18 - +25 ° С.

По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки 3 рази. При кожній промивці в усі лунки додати по 400 мкл розчину для промивання ,приготованого за п. 7.1.5 , струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з наступним декантуванням . Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу .

7.2.7 . Негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ . Інкубувати стріпи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) протягом 15хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення .

Примітка: максимальна оптична густини не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу . Рекомендована максимальна оптична густини не більше 2,5 од. ОГ .

7.2.7 . Додати в усі лунки з тією ж швидкістю і в тій же послідовності , як і розчин ТМБ , по 50 мкл Стоп- реагенту для зупинки ферментної реакції , перемішати на шейкері протягом 1-2 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С)

7.2.8 . Якщо неможливо виміряти оптичну густини у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.7 . , То слід мати на увазі , що забарвлення в лунках

планшета стабільна не більше 20 хвилин при температурі +18 ... 25 ° С.

8 . РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти на фотометрі вертикального сканування оптичну густини у лунках при довжині хвилі 450 нм. При реєстрації результатів необхідно відніматися величину оптичної густини в лунках А1 і А2 з значень оптичної густини всіх інших лунок.

Примітка: середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках А1 і А2 не повинно перевищувати 0,09 од.ОГ.

9 . ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

9.1 . Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації PAPP -А (мкг/мл) в калібрувальних пробах (Малюнок 1). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення вісей .

Примітка: для побудови калібрувального графіка на масштабній папері необхідно використовувати дані оптичної густини після вирахування з них середньої величини оптичної густини лунок з ТМБ. Якщо програма фотометра не дозволяє відніматися величину оптичної густини лунок А1 і А2 , то необхідно користуватися формулою :

$$B - B_T ,$$

де В - середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках , що містять калібрувальні або досліджувані проби;

B_T - середнє арифметичне значення оптичної густини лунок А1 і А2.

9.2 . Визначити зміст PAPP - А в пробах за калібрувальним графіком. У разі додаткового розведення зразків необхідно виміряти концентрацію PAPP - А помножити на коефіцієнт розведення .

9.3 . Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації PAPP - А , що перевищують номінал КП № 6 , не допускається. Для точного визначення концентрації PAPP - А в таких зразках необхідно виконати їх розведення у відповідності з п. 7.1.9 .

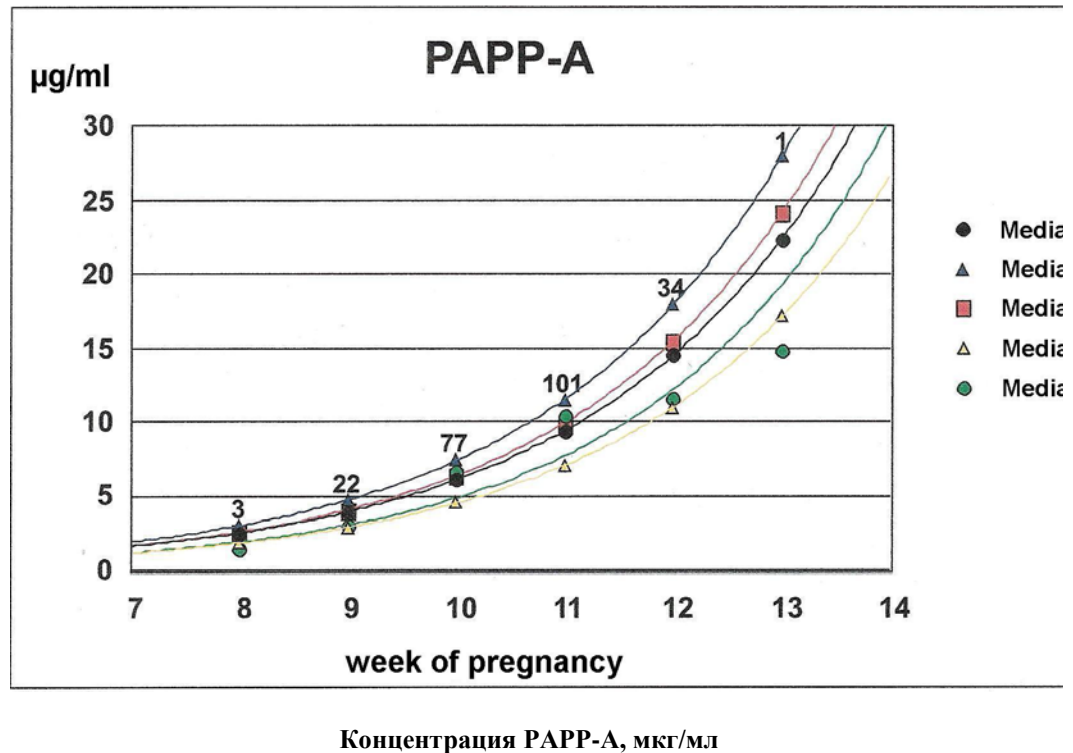
9.4 . Для розрахунку ризику в пренатальному скринінгу результати вимірювання PAPP -А вказуються в MOM (multiple of medians) і обчислюються за формулою: MOM = Виміряна концентрація (PAPP -А) / Медіана PAPP -А

9.5 . Для автоматизованого розрахунку ризику синдрому Дауна можна скористатися спеціальним програмним забезпеченням .

Калібрувальні проби	Оптичні одиниці (450 нм)
КП №1 (0 мкг/мл)	0.18
КП №2 (1 мкг/мл)	0.38
КП №3 (2.5 мкг/мл)	0.56

КП №4 (5 мкг/мл)	0.83
КП №5 (15 мкг/мл)	1.44
КП №6 (30 мкг/мл)	1.80

ОГ при 450 нм



Малюнок 1 . Типовий калібрувальний графік

10 . УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промивочний розчин підготовлений до використання зберігати не більш 5 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 18 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в **ТОВ «Бест Діагностик»** за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право в разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.