

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ АСОЦІЙОВАНОГО З ВАГІТНІСТЮ ПРОТЕЇНУ-А ПЛАЗМИ

7925-300, Pregnancy Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) Test System

Каталог. №: **7925-300**

Методика від **26-07-2013**

Кількість : **96**

Версія **1**

Виробник : **Monobind Inc., (США)**



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення концентрації PAPP-A в сироватці крові людини з використанням мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричний.

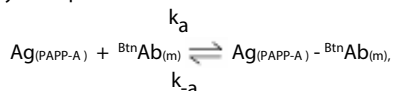
2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (тип 4)

Справжні реагенти, що вимагаються для імуноферментного аналізу, включають високоафінні і специфічні антитіла в надмірній кількості (кон'юговані з ферментом і іммобілізовані), що розпізнають різні індивідуальні епітопи і природний антиген. В ході аналізу на поверхні мікролунок відбувається іммобілізація при взаємодії стрептавідину, що нанесений в лунках, і доданих екзогенних біотинильованих моноклональних анти-PAPP-A антитіл.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Одночасно біотин, прикріплений до антитіла, зв'язується з стрептавідином, нанесеним в лунках, в результаті відбувається іммобілізація комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = біотинильовані моноклональні антитіла (надмірна кількість);

$\text{Ag}_{(\text{PAPP-A})}$ = нативний антиген (змінна кількість);

$\text{Ag}_{(\text{PAPP-A})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = комплекс антиген-антитіло;

k_a = константа швидкості асоціації

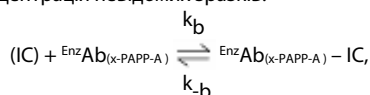
k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$\text{Ag}_{(\text{PAPP-A})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})} + \text{стрептавідин}_{\text{СВ}} \Rightarrow \text{іммобілізований комплекс (IC)}$

Стрептавідин_{СВ} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від непов'язаних антигенів декантацією або промиванням. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В лунках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту в лунці прямо пропорційна концентрації нативного вільного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



$\text{EnzAb}_{(\text{x-PAPP-A})}$ = фермент-мічені антитіла (надмірна кількість);

$\text{EnzAb}_{(\text{x-PAPP-A})} - \text{IC}$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори PAPP-A - 1 мл/флакон

6 флаконів референтної сироватки (стандартів) з концентраціями PAPP-A 0 (A), 100 (B), 500 (C), 1500 (D), 5000 (E) і 1000 (F) мМОД/л. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

B. Ферментний реагент PAPP-A – 12 мл/флакон

Один (1) флакон кон'югату PAPP-A (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в стабілізуючій білковій матриці. Зберігати при температурі 2-8 °С.

C. Біотиновий Реагент PAPP-A - 12 мл/флакон

Один (1) флакон реагенту містить кон'югат анти-PAPP-A біотинильованих очищених IgG кролика в буфері, з консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °С.

D. Контроль PAPP-A – 0.5 мл/флакон

Один (1) флакон стандарту сироватки для PAPP-A у встановленій концентрації (точне значення вказано на етикетці). Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

E. Розчинник PAPP-A – 5.0 мл/флакон

Один (1) флакон буфера на основі людської сироватки з солями, поверхнево-активними речовинами і консервантами. Зберігати при температурі 2-8 °С.

F. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

G. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

H. Субстратний розчин - 12 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

I. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5M H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °С.

J. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 10, 50 і 100 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.020 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
- Додайте піпеткою по 10 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) Біотинового Реагенту анти-PAPP-A в усі лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
- Накрити і інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще чотири рази (загальна кількість циклів промивки - 5). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту PAPP-A у кожен лунку.
- Накрити і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його.
- Повторіть процедуру ще чотири рази (загальна кількість циклів промивки - 5). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.**

Примітка: Розвести зразки, концентрація яких, можливо, вище 10000 мМОд/л з '0' мМОд/л калібратором і помножити результат на коефіцієнт розведення. Для розведення 1:5 додати 40 мкл калібратора '0' мМОд/л до 10 мкл зразка високої концентрації.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації PAPP-A в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

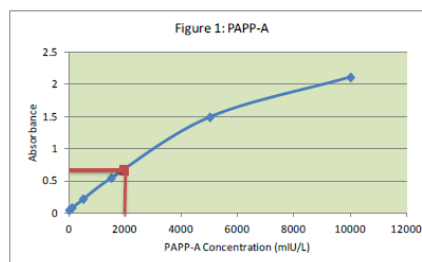
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації PAPP-A в мМОд/л (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації PAPP-A в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.586 перетинає стандартну криву при 1240 мМОд/л (див. мал.1)

Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (мМОд/л)
Калібратор А	A1	0.044	0.044	0
	B1	0.043		
Калібратор В	C1	0.079	0.080	100
	D1	0.082		
Калібратор С	E1	0.208	0.218	500
	F1	0.226		
Калібратор D	G1	0.568	0.546	1500
	H1	0.521		
Калібратор E	A2	1.533	1.488	5000
	B2	1.464		
Калібратор F	C2	2.189	2.107	10000
	D2	1.967		
Контроль 1	E2	0.652	0.669	1957
	F2	0.686		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «0» мМОд/л повинна бути ≥ 1.3
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ELISA були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
- Для отримання дійсних результатів адекватній контролі та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані неврно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених довідкових інтервалів для "нормального" дорослого населення, очікувані діапазони для тестової системи AccuBind® ELISA PAPP-A докладно описані в таблиці 1.

Рекомендується порівняти значення на основі МоМ, встановлених для лабораторії при аналізі зразків пацієнтів. Розділивши значення зразка пацієнта на МоМ дасть значення у відсотках, яке часто використовується для оцінки.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для системи PAPP-A AccuBind® ELISA Test

Term of Gestation (full weeks)	PAPP-A Concentration (mIU/L)
9	650
10	1200
11	1700
12	2800
13	3900

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватися на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору PAPP-A всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мМОд/л)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Контроль Рівень 1	24	383.4	9.66	2.5
Контроль Рівень 2	24	1817.2	65.69	3.6
Контроль Рівень 3	24	4641.1	242.91	5.2

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мМОд/л)

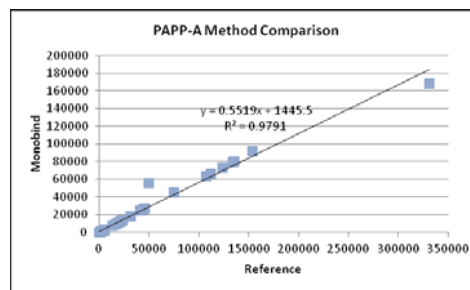
Взірець	N	x	δ	C.V., %
Контроль Рівень 1	10	381.3	27.54	7.2
Контроль Рівень 2	10	1900.3	97.13	5.1
Контроль Рівень 3	10	4905.0	255.92	5.2

14.2 Чутливість

Чутливість методу – 3.12 мМОд/л для даного набору.

14.3 Достовірність

Тестову систему AccuBind® ELISA PAPP-A порівнювали з референтним імунологічним методом. Були використані біологічні зразки низьких, нормальних і відносно високих рівнів PAPP-A; значення коливались від 15 мМОд/л до 331099 мМОд/л. Загальна кількість таких зразків склала 50.



Parameter	Monobind	Reference
Low	15	24
High	168659	331099
Mean	18908	31642
Intercept		1445.5
Slope		0.5519
Corr (R ²)		0.9791

14.4 Специфічність

% перехресної реактивності антитіл PAPP-A на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перехресна реактивність була обчислена шляхом виведення відношення між дозою додаткової речовини і дозою PAPP-A, необхідної для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

ТАБЛИЦЯ 4

Substance	Cross Reactivity
Free β hCG	ND
AFP	ND
hPRL	ND
FSH	ND



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

