

НАБОР АБПП-А [I-125] IRMA (Номер по каталогу RK-4CT)

Система ¹²⁵I-АБПП-А IRMA предназначена для прямого количественного определения ассоциированного с беременностью плазменного протеина-А (АБПП-А) *in vitro* в сыворотке в диапазоне 0-45 мкг/мл. Каждый набор содержит материалы, достаточные для анализа 100 пробирок, что позволяет составить одну стандартную кривую и проанализировать 42 неизвестных образца в двух экземплярах.

Введение

Ассоциированный с беременностью плазменный протеин-А является крупным гликопротеином плаценты. Биологическая функция АБПП-А до конца не изучена. Известно, что он обладает протеолитическим и иммунорегулирующим действием за счет расщепления инсулиноподобного фактора роста связывающего белка 4. Концентрация АБПП-А в сыворотке крови матери повышается во время беременности. В большинстве случаев значения ниже 0,5 КМ (кратное медиане) свидетельствуют о патологии, однако один лишь АБПП-А не имеет диагностического значения.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченное ¹²⁵I, связывается с эпитопом молекулы АБПП-А, которая пространственно отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два указанных антитела одновременно реагируют с антигеном, который содержится в стандартах и в образцах сыворотки, что приводит к образованию комплекса захватывающее антитело – антиген – сигнальное антитело, который также называется «сэндвич». Во время двухчасовой инкубации при непрерывном перемешивании иммунный комплекс оседает на поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь удаляется, пробирки тщательно промываются с последующим определением радиоактивности в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна уровню радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество АБПП-А, может быть определена искомая концентрация АБПП-А в образцах пациента.

Содержимое набора

- 1 флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию. Содержит около 740 кБк ¹²⁵I-анти-АБПП-А и захватывающих анти-АБПП-А антител в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ, (6 x 0,4 мл) готовых к использованию (S1-S6): 0, 0.45, 1.35, 4.5, 13.5, 45 мкг/мл (1 МЕ/л = 4.5 мкг/мл) в сыворотке с 0.1% NaN₃. В случае отсутствия международного справочного раствора приготовление стандартно осуществляется гравиметрически с использованием высокоочищенного (>99%) АБПП-А (FITZGERALD 30AP66).
- 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ, (2 x 0,4 мл) готовой к использованию, содержащей 0.1% NaN₃. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2 x 50 пробирок для проведения реакции, 12x75 мм, упакованных в пластиковые коробки.
- 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащий 0.2% NaN₃. См. Раздел «Подготовка реагентов».

Сертификат качества

Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (10, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой смеситель, шейкер, полимерная пленка, абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Высокоточные автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром 1 л (вместо пипеток 2 мл)

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии со стандартными процедурами, применяемыми в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°C). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторного замораживания/оттаивания. Запрещается использовать липемичные, гемолизированные и мутные образцы.

Приготовление и хранение реактивов

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды для получения 720 мл промывочного раствора. Полученный разбавленный раствор следует хранить при температуре 2-8 °С до истечения срока годности. После вскрытия реактивы следует хранить при температуре 2-8 °С. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до окончания срока годности. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Перед использованием следует тщательно перемешать все реактивы и образцы. Необходимо избегать чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения (Краткое описание см. в Таблице 1.)

- 1 Промаркируйте пробирки с покрытием в двух экземплярах для каждого стандарта (S1-S6), контрольной сыворотки и образцов.
- 2 Гомогенизируйте все реагенты и образцы путем аккуратного перемешивания, при этом избегайте образования пены.
- 3 Внесите по 10 мкл стандарта, контроля и образца в соответствующим образом промаркированные пробирки. Для установки пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность и дно пробирок наконечником пипетки.
- 4 Внесите по 200 мкл метки в каждую пробирку.
- 5 Закройте все пробирки пластиковой пленкой. Прочно установите штатив с пробирками на подставку шейкера. Включите шейкер и установите необходимую скорость, чтобы в каждой пробирке жидкость постоянно вращалась и перемешивалась.
- 6 Помешивая, проводите инкубирование пробирок в течение 2 часов при комнатной температуре (рекомендуется 200–600 об/мин).
- 7 Внесите по 2.0 мл разведенного промывочного буфера в каждую пробирку. Слейте супернатант из всех пробирок, перевернув штатив. В перевернутом положении поместите штатив на фильтровальную бумагу на 2 минуты.
- 8 Переверните штатив с пробирками в нормальное положение, и повторите Шаг 7 еще два раза.
- 9 Посчитайте радиоактивность каждой пробирки в течение не менее 60 секунд в гамма- счетчике.

10 Рассчитайте концентрацию АБПП-А в образцах так, как это описано в разделе «Расчет результатов» или используя специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в мкл)

Пробирки	Всего	Стандарт	Конт-роль	Обра-зец
Стандарт		10		
Контроль			10	
Образец				10
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 2 часов при комнатной температуре				
Промывной буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Промывной буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Промывной буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Подсчитать радиоактивность (60 сек на пробирку)				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (срм) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контроля и образца, используя следующую формулу:

$$V/T(\%) = \frac{S_{2,6} / C / M_x (\text{срм}) - S_1 (\text{срм})}{T(\text{срм})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте калибровочную кривую, откладывая рассчитанные значения В/Т (%) для каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации АБПП-А по другой.

Определите концентрацию АБПП-А в тестируемых образцах путём интерполяции с калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, лежащие вне диапазона концентраций калибровочной кривой.

Из доступных компьютерных программ для обработки данных с целью аппроксимации могут использоваться логит-логарифмические и сплайновые методы. Также возможно применение систем автоматической обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Количество срм	Среднее срм	В/Т%
T	324642 330422	327532	-
S1	73 101	87	0.03
S2	2564 2627	2564	0.76
S3	7583 7386	7485	2.26
S4	25131 24176	24654	7.50
S5	71400 69580	70490	21.55
S6	178872 180902	179887	54.90
C1	35452 37484	36468	11.11
C2	68212 64829	66520	20.28

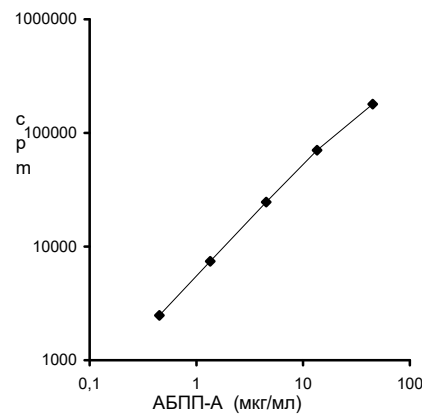


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для расчёта результатов количественного определения!)

Характеристики количественного определения

Типичные параметры количественного определения

Чувствительность

Значение аналитической чувствительности 0.0143 мкг/мл было получено при тестировании 15 повторов нулевого стандарта. Чувствительность была определена как концентрация, соответствующая сумме среднего значения срм и двух стандартных отклонений.

Тест разведения (линейность)

Исследование 5 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Приведенная ниже формула, полученная для измеренной (Y) концентрации против ожидаемой (X), указывает на хорошую линейность:

$$Y = 1.047x - 0.08 \quad R = 0.9995 \quad n = 25$$

Точность и воспроизводимость

Для оценки точности в ходе количественного определения были исследованы 7 контрольных образцов в 15 повторах. Для оценки точности между количественными определениями были исследованы 7 контрольных образцов дважды в 22 независимых анализах с использованием различных партий наборов. Полученные данные представлены ниже.

В ходе количественного определения		Между количественными определениями	
Среднее значение (мкг/мл)	CV %	Среднее значение (мкг/мл)	CV %
6.57	6.20	6.75	2.80
12.31	1.68	12.74	2.73
1.91	4.07	1.82	3.07
4.11	4.69	4.04	2.98
7.04	4.12	6.96	3.84
15.06	4.51	15.53	3.82
27.47	3.49	27.43	2.88

Восстановление

Под восстановлением понималось измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиков в образцах сыворотки крови с известным количеством АБПП-А. Среднее значение восстановления для 5 образцов сыворотки крови с АБПП-А (4 уровня) составляло: $99.4 \pm 3.3\%$ (среднее значение \pm СО).

Эффект крючка

При концентрациях АБПП-А до 800 мкг/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует. Образцы с концентрацией, превышающей максимальную концентрацию стандарта, необходимо разбавить нулевым стандартом и повторно провести количественное определение.

Ожидаемые значения

Неделя беременности	1 КМ (мкг/мл)	N
10	8.92	22
11	10.51	500
12	14.75	1833
13	20.54	775

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственный диапазон справочных значений для собственной популяции пациентов. Полученные результаты следует интерпретировать только в контексте общей клинической картины. Ни один из наборов для диагностики in vitro не может быть использован в качестве единственного доказательства наличия какого-либо заболевания или расстройства.

Примечания к методике

1) Причина ошибки! Реактивные пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы эти пробирки не смешались с обычными пробирками для проведения исследований. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования.

а оставшиеся после работы положите обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется пометить маркером.

2) Причина ошибки! Для обеспечения эффективного перемешивания пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытыми отверстиями. Неравномерное или неполное перемешивание могут привести к низкой эффективности количественного определения.

3) Добавление промывочного буфера

Для добавления промывочного буфера рекомендуется использование обычного лабораторного диспенсера со стекляннной емкостью объемом 1 л и гибкого выпускника для пробирки. При отсутствии данного оборудования можно использовать шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за обеспечение соблюдения местных норм и правил, касающихся обращения с радиоактивными материалами.

Биологическая опасность

Компоненты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуоферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (Анти-ВИЧ-1/2), антитело против гепатита С (анти-ВГС), антитело к трепонеме и поверхностный антиген гепатита В (HBsAg).

Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного

отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Все продукты животного происхождения и производные были получены от здоровых животных. Тем не менее, с компонентами, содержащими вещества животного происхождения, следует обращаться как с *потенциально инфекционными материалами*.

Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Общее содержание азидов в каждой упаковке составляет 64,2 мг.

Хранение и срок годности

Храните этот продукт при температуре 2-8°C.

Срок годности: 60 дней от наличия.



Годен до

CONTROL

Контроль



Номер партии

CAL

Стандарт



Внимание, обратитесь к сопроводительным документам

GT

Пробирка с покрытием



Биологическая опасность

TRAC

Метка



Обратитесь к инструкции по использованию

WASHB

Промывочный буфер



Устройство для проведения диагностики in vitro



Температурный предел хранения при температуре 2-8°C



Производитель



Радиоактивный материал

REF

Номер по каталогу



Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

INSTITUTE OF ISOTOPES CO. LTD.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: +36-1-392-2577,

Факс: +36-1-395-9247

Версия: май 2023 г.