



DCM184-2
Ed. 04/2016

PAPP-A

per analisi di routine

Determinazione quantitativa immunoenzimatica del PAPP-A (Proteina Plasmatica A associata alla gravidanza) nel siero umano

IVD



LOT

See external label

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO184

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di PAPP-A (Proteina Plasmatica A associata alla gravidanza) nel siero umano.

Il Kit PAPP-A è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

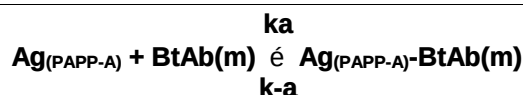
PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) è una proteina di 740 kDa prodotta principalmente dalla placenta durante la gravidanza; questa proteina è di solito presente nel siero, ma la sua concentrazione aumenta nel siero materno mano a mano che il tempo di gestazione progredisce.

I livelli di PAPP-A nel siero materno sono indicativi di minaccia di aborto, parto prematuro, ritardo di crescita intrauterina e altri. Molti studi hanno mostrato una diminuzione della concentrazione di PAPP-A in caso di disturbi legati alla Trisomia, specialmente nella Sindrome di Down (Trisomia 21). La proteina PAPP-A può essere rilevata nel siero in forma di dimero eterotetramero con ProMBP (forma più importante durante la gravidanza), o in una forma dimerica associata a problematiche coronariche e cardiache; Diametra PAPP-A ELISA è progettato specificamente per la detezione della forma eterotetramero. La valutazione della concentrazione di PAPP-A sfrutta l'analisi "multiplo di mediane (MoM)" e viene presentata come percentuale della mediana. Senza un facile accesso ad un IRP, il metodo ELISA è il modo più semplice per valutare la concentrazione di PAPP-A nel siero e confrontare i risultati di diversi laboratori.

2. PRINCIPIO

I reagenti essenziali richiesti per un dosaggio immunoenzimometrico includono anticorpi ad alta affinità e specificità (legati ad un enzima e immobilizzati), con epitopi diversi e distinti, in eccesso, e l'antigene nativo. In questa procedura, l'immobilizzazione avviene sulla superficie della micropiastre attraverso l'interazione della streptavidina coattata nei pozzetti e l'anticorpo monoclonale biotinilato anti PAPP-A.

Quando l'anticorpo monoclonale biotinilato viene miscelato con un siero contenente l'antigene di PAPP-A, si forma un complesso antigene-anticorpo. L'interazione è illustrata nella seguente equazione:



BtAb(m) = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

Ag_(PAPP-A) = antigene nativo (quantità variabile)

Ag_(PAPP-A)-BtAb(m) = complesso antigene-anticorpo (quantità variabile)

k_a = tasso costante di associazione

k_{-a} = tasso costante di dissociazione

Contemporaneamente, il complesso si deposita nel pozzetto attraverso la reazione ad alta affinità tra streptavidina ed anticorpo biotinilato.

Questa interazione è illustrata di seguito:



Streptavidina C.W. = streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Complesso immobilizzato = complesso sandwich legato al pozzetto

Dopo un periodo di incubazione, la frazione anticorpo-antigene legata è separata dall'antigene non legato mediante uno step di lavaggio.

Successivamente viene aggiunto un altro anticorpo (diretto contro un diverso epitopo) marcato con un enzima. Un'altra interazione si realizza per formare un complesso enzima-anticorpo-antigene-anticorpo biotinilato sulla superficie dei pozzetti.

L'enzima in eccesso viene lavato via attraverso una fase di lavaggio. Un substrato adatto viene quindi aggiunto per produrre una colorazione misurabile con l'uso di uno spettrofotometro per micropiastre.

L'attività enzimatica nei pozzetti è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo. Utilizzando diversi calibratori sierici aventi concentrazione di antigene noto, può essere realizzata una curva dose-risposta da cui ricavare la

concentrazione di antigene di un campione sconosciuto.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 0.5 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/18406-0
CAL1	REF DCE002/18407-0
CAL2	REF DCE002/18408-0
CAL3	REF DCE002/18409-0
CAL4	REF DCE002/18410-0
CAL5	REF DCE002/18411-0

2. Control (1 vial, 0.5 mL)

Siero positivo al PAPP-A. La concentrazione del Controllo è indicata nel Certificato di Analisi.

REF DCE045/18403-0

3. Biotin Reagent (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo monoclonale biotinilato anti PAPP-A

REF DCE019/18419-0

4. Enzyme Reagent (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo monoclonale anti PAPP-A coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/18402-0

5. Coated Microplate (1 micropiastrella breakable)

Micropiastrella coattata con streptavidina

REF DCE002/18403-0

6. PAPP-A Diluent (1 flacone, 5 mL)

Tampone contenente siero umano

REF DCE053/18453-0

7. TMB Substrate (1 flacone, 12 mL)

H₂O₂-TMB (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004/18404-0

8. Stop Solution (1 flacone, 8 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005/18405-0

9. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

Soluzione tamponata

REF DCE006/18406-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile 2 mesi a 2-8°C.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.

- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si

raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunzione del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunzione della Stop Solution. L'aggiunzione del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori contengono siero umano, sono ottenuti da sostanza pura di PAPP-A e hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/L	0	100	500	1500	5000	10000

Una volta aperti sono stabili 2 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Il dosaggio può essere effettuato in siero umano. Osservare le consuete precauzioni nella raccolta dei campioni derivati da sangue. Per un confronto approfondito per stabilire valori nella norma, è consigliabile utilizzare un campione di siero ottenuto la mattina a digiuno. Il sangue deve essere raccolto nelle apposite provette per prelievi, senza additivi o altro. Lasciare coagulare il sangue e centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule. I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Se i campioni non possono essere dosati entro questo tempo, possono essere conservati a -20°C fino a 30 giorni. Evitare l'uso di dispositivi contaminati. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se testati in duplicato, sono necessari 0.020 mL di campione. In caso di campioni con concentrazioni di PAPP-A superiori a 10000 mIU/L diluire il campione 1:5 (o più) con il PAPP-A Diluent (reattivo 6); considerare questa diluizione nel calcolo del risultato finale.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile 30 giorni a temperatura ambiente (22-28°C).

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	10 µL		
Campione		10 µL	
Biotin Reagent	100 µL	100 µL	
Agitare delicatamente la micropiastra per 20-30 secondi. Coprire la micropiastra con un foglio di carta o simili. Incubare 60 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 5 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,350 mL di soluzione di lavaggio diluita.			
Nota importante: agitare delicatamente la piastra per 5 secondi ad ogni step per assicurare un corretto lavaggio. <u>Dopo l'ultimo step, rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.</u>			
Enzyme Reagent	100 µL	100 µL	
Coprire la micropiastra con un foglio di carta o simili. Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 5 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,350 mL di soluzione di lavaggio diluita.			
Nota importante: agitare delicatamente la piastra per 5 secondi ad ogni step per assicurare un corretto lavaggio. <u>Dopo l'ultimo step, rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.</u>			

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Non agitare la micropiastra dopo l'aggiunta del TMB Substrate. Coprire la micropiastra con un foglio di carta o simili. Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) al buio.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Agitare delicatamente la micropiastra per 15-20 secondi. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o azzerando con il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli bassi, normali e alti di PAPP-A per monitorare la performance del kit. Questi controlli devono essere trattati come sconosciuti e i valori determinati in ogni seduta.

I fogli di controllo qualità dovrebbero essere mantenuti per seguire le performance dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare il trend. Ogni laboratorio dovrebbe scegliere i limiti di accettabilità delle performance del kit. Altri parametri da monitorare includono le intercette 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità inter-assay. Inoltre, l'assorbanza massima dovrebbe rispecchiare i valori delle sedute precedenti. Deviazioni significative dalle performance stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Usare reagenti freschi per determinare le ragioni delle variazioni.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

Per determinare la concentrazione di PAPP-A in campioni incogniti si utilizza una curva dose-risposta.

1. Registrare le assorbanze ottenute del lettore di micropiastre.
2. Riportare le assorbanze di ogni punto rispetto alla concentrazione corrispondente di PAPP-A in mIU/L su carta millimetrata.
3. Tracciare la miglior curva passante per i punti.
4. Per determinare la concentrazione di PAPP-A in un campione sconosciuto localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva, e leggere la concentrazione (in mIU/L) sull'asse orizzontale del grafico. Nel seguente esempio, l'assorbanza media (0,586) interseca la curva dose-risposta a 1240 mIU/L di concentrazione di PAPP-A.

Nota: possono essere utilizzati anche software per l'analisi dei dati per saggi ELISA. Se viene utilizzato un software, accertarsi che sia stato validato.

8.1. Esempio di Calcolo

I valori sotto riportati devono essere considerati unicamente un esempio e non devono essere utilizzati in luogo dei dati sperimentali.

Calibratore /Campione	OD 450 nm	OD media	Valore PAPP-A mIU/L
Cal 0	0.035	0.041	0
	0.046		
Cal 1	0.159	0.152	100
	0.145		
Cal 2	0.302	0.289	500
	0.276		
Cal 3	0.519	0.499	1500
	0.478		
Cal 4	1.052	1.043	5000
	1.033		
Cal 5	2.706	2.665	10000
	2.625		
Campione	0.564	0.586	1240
	0.608		

9. PARAMETRI DI CONTROLLO QUALITÀ

Rispettare i parametri di accettazione indicati nel Certificato di Analisi, sia per le OD che per i Controlli.

10. VALORI DI RIFERIMENTO

Si consiglia di confrontare i valori in base ai Multipli della Mediana (MoM) stabiliti dal laboratorio per valutare i campioni dei pazienti. Dividendo il valore del campione dal paziente per il MoM si ottiene un valore percentuale che viene usato frequentemente per la valutazione.

In accordo con gli intervalli di riferimento stabiliti per una popolazione adulta normale, gli intervalli previsti per il Diametra PAPP-A test sono i seguenti:

Durata della gestazione (settimane intere)	PAPP-A Conc. (mIU/L)
9	650
10	1200
11	1700
12	2800
13	3900

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbicante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Precisione

L'intra- e inter-assay sono stati determinati mediante analisi su tre differenti livelli di pool di sieri di controllo:

Intra assay				
Siero	Media mIU/L	SD	% CV	Replicati
1	383.4	9.66	2.5	24
2	1817.2	65.69	3.6	24
3	4641.1	242.91	5.2	24

Inter assay				
Siero	Media mIU/L	SD	% CV	Replicati
1	381.3	27.54	7.2	10
2	1900.3	97.13	5.1	10
3	4905.0	255.92	5.2	10

11.2. Sensibilità

La sensibilità analitica (detection limit) è stata calcolata determinando la variabilità del Calibratore 0 e considerando 2 deviazioni standard. La sensibilità del test è 34 mIU/L.

11.3. Correlazione

Il kit Diametra PAPP-A è stato comparato con un test immunologico di riferimento. Sono stati testati 50 sieri a concentrazioni basse, medie ed alte.

La curva di regressione è:

$$Y = 0,5519 \cdot X + 1445,5$$

$$(R^2=0,9791)$$

11.4. Specificità

La cross-reattività dell'anticorpo anti PAPP-A verso altre sostanze selezionate è stata determinata aggiungendo le sostanze interferenti ad una matrice sierica. La cross-reattività è stata calcolata analizzando il rapporto tra dose di sostanza interferente e dose di PAPP-A necessaria a spiazzare la stessa quantità di analogo.

Sostanza	Cross-reattività
Free b-HCG	ND
AFP	ND
hPRL	ND
FSH	ND

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Sorensen S. *Clinical Chemistry*. 2011, 57, 1023-1031.
2. Qin QP. *Clinical Chemistry*. 1997, 43, 2323-2332.
3. Fialova L., Malbohan IM. *Bratisl Lek Listy*. 2002, 103, 194-205.
4. Kagan KO. *Ultrasound Obste Gynecol*. 2008, 31, 493-502.
5. Spencer K. *Ultrasound Obste Gynecol*. 1999, 13, 231-237.
6. Baluja-Conde IB. *Rev Biomed*. 2005, 259-271.
7. Smith GCS. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
8. Ong YTC. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2000, 107, 1265-1270.
9. Bischof P. *Archives of Gynecology*. 1979, 227, 315-326

Ed. 04/2016

DCM184-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM184-2
Ed. 04/2016

PAPP-A

for routine analysis

Quantitative immunoenzymatic determination of PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) concentration in human serum.

IVD



LOT

See external label

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF

DKO184

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) concentration in human serum. PAPP-A kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) is a 740 kDa protein produced primarily by the placenta during pregnancy; in fact this protein is usually present in the serum, but its concentration rises in maternal serum as gestation time progresses. PAPP-A concentration levels in maternal serum are indicative of threatened abortion, preterm birth, intrauterine growth restriction and others.

Many studies have shown a decrease in PAPP-A concentration in case of trisomy disorders, particularly in Down's Syndrome (Trisomy 21).

PAPP-A protein can be found in the serum in a heterotetrameric dimer with ProMBP form (most important during pregnancy) or in a dimeric form associated with coronary and cardiac conditions; Diametra PAPP-A ELISA is designed specifically for the testing of the heterotetrameric form.

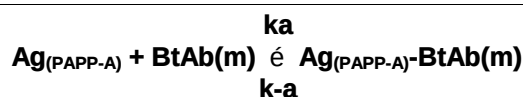
When evaluation of this protein is done it is often compared to the Multiple of Medians (MoM) and represented as a percent of an in-house establish median. Without easy access to an IRP, ELISA method is an easier way to evaluate the concentration of PAPP-A in the serum and to compare the results from different laboratories.

2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymometric assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilized), with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen. In this procedure, the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through

the interaction of the streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti PAPP-A antibody.

When monoclonal biotinylated antibody is mixed with a serum containing the PAPP-A antigen, an antibody-antigen complex is formed. The interaction is illustrated in the following equation:



BtAb(m) = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

Ag_(PAPP-A) = native antigen (variable quantity)

Ag_(PAPP-A)-BtAb(m) = antigen-antibody complex (variable quantity)

k_a = rate constant of association

k_a = rate constant of dissociation

Simultaneously, the complex is deposited into the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:



Streptavidin C.W. = Streptavidin immobilized on well
Immobilized complex = sandwich complex bound to the well

After a suitable incubation period, the antibody-antigen bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step. Another antibody (directed at a different epitope) labelled with an enzyme is added. Another interaction occurs to form an enzyme labelled antibody-antigen-biotinylated-antibody complex on the surface of the wells.

Excess enzyme is washed off via a wash step. A suitable substrate is added to produce color measurable with the use of a microplate spectrophotometer.

The enzyme activity in the well is directly proportional to the native antigen concentration. By utilizing several different serum references of known antigen concentration, a dose response curve can

be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATIONS

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)

CAL0	REF DCE002/18406-0
CAL1	REF DCE002/18407-0
CAL2	REF DCE002/18408-0
CAL3	REF DCE002/18409-0
CAL4	REF DCE002/18410-0
CAL5	REF DCE002/18411-0

2. Control (1 vial, 0.5 mL)

Positive serum to PAPP-A. Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis.

REF DCE045/18403-0

3. Biotin Reagent (1 vial, 12 mL)

Biotinylated monoclonal anti PAPP-A antibody

REF DCE019/18419-0

4. Enzyme Reagent (1 vial, 12 mL)

Monoclonal anti PAPP-A antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/18402-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin

REF DCE002/18403-0

6. PAPP-A Diluent (1 vial, 5 mL)

Human serum based buffer

REF DCE053/18453-0

7. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004/18404-0

8. Stop Solution (1 vial, 8 mL)

Sulphuric acid 0,15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005/18405-0

9. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

Buffered solution

REF DCE006/18406-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable 2 months at 2-8°C.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.

- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the

addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The calibrators are human serum based, are obtained from pure state PAPP-A protein and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/L	0	100	500	1500	5000	10000

Once opened, the Calibrators are stable 2 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample

The assay can be performed in human serum.

The usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed. For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained. The blood should be collected in a plain red-top venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot, centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid use of contaminated devices. Avoid repetitive freezing and thawing. When assayed in duplicate, 0.020 mL of the specimen is required.

For samples with PAPP-A concentration > 10000 mIU/L, dilute the sample (for example 1:10) with PAPP-A Diluent (reagent 6); consider this dilution during the calculation of the final result.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at room temperature (22-28°C).

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	10 µL		
Sample		10 µL	
Biotin Reagent	100 µL	100 µL	
Shake the microplate gently for 20-30 seconds to mix. Cover with a plastic wrap or microplate cover. Incubate for 60 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well; wash the wells 5 times with 0.350 mL of diluted wash solution. Important note: gently shake the plate for 5 seconds at each washing step to ensure proper cleaning. <u>After the last wash remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.</u>			
Enzyme Reagent	100 µL	100 µL	
Cover with a plastic wrap or microplate cover. Incubate for 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well; wash the wells 5 times with 0.350 mL of diluted wash solution. Important note: gently shake the plate for 5 seconds at each washing step to ensure proper cleaning. <u>After the last wash remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.</u>			

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Do not shake the plate after substrate addition. Cover with a plastic wrap or microplate cover. Incubate at room temperature (22-28°C) for 20 minutes in the dark.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Shake the microplate gently for 15-20 seconds. Read the absorbance (E) at 450 nm using a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at low, normal and high range of PAPP-A for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. CALCULATION OF RESULTS

A dose response curve is used to ascertain the concentration of human PAPP-A in unknown specimens.

1. Record the absorbance obtained from the printout of the microplate reader.
2. Plot the absorbance for each duplicate serum reference versus the corresponding PAPP-A concentration in mIU/L on linear graph paper (do not average the duplicates of the serum references before plotting)
3. Draw the best fit curve through the plotted points.
4. To determine the concentration of PAPP-A for an unknown locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in mIU/L) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated). In the following example, the average absorbance (0.586) intersects the dose response curve at 1240 mIU/L PAPP-A concentration.

Note: computer data reduction software designed for ELISA assays may also be used for the data

reduction. If such software is utilized, the validation of the software should be ascertained.

8.1. Example of Calculation

The values shown below must be considered as an example and must not be used in place of experimental data.

Calibrator /Sample	OD 450 nm	Mean OD	Value PAPP-A mIU/L
Cal 0	0.035	0.041	0
	0.046		
Cal 1	0.159	0.152	100
	0.145		
Cal 2	0.302	0.289	500
	0.276		
Cal 3	0.519	0.499	1500
	0.478		
Cal 4	1.052	1.043	5000
	1.033		
Cal 5	2.706	2.665	10000
	2.625		
Sample	0.564	0.586	1240
	0.608		

9. QUALITY CONTROL PARAMETERS

Respect the assigned ranges indicated on the Certificate of Analysis lot-specific, for both OD and Controls.

10. REFERENCE VALUES

It is recommended to compare values based on the Multiple of Median (MoM) established for the laboratory when assessing patient samples. By dividing the value of the patient sample by the MoM will give a percent value that is used frequently for evaluation.

In agreement with established reference intervals for a normal adult population, the expected ranges for Diametra PAPP-A test are:

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

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of

expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision

The intra and inter assay precisions were determined by analyses on three different levels of pool control sera:

Intra assay				
Serum	Mean mIU/L	SD	% CV	Replicates
1	383.4	9.66	2.5	24
2	1817.2	65.69	3.6	24
3	4641.1	242.91	5.2	24

Inter assay				
Serum	Mean mIU/L	SD	% CV	Replicates
1	381.3	27.54	7.2	10
2	1900.3	97.13	5.1	10
3	4905.0	255.92	5.2	10

11.2. Sensitivity

The analytical sensitivity (detection limit) was calculated by determining the variability of the 0 mIU/L serum calibrator and using 2 standard deviation (95% certainty) statistics to calculate the minimum dose. The assay sensitivity was found to be 34 mIU/L.

11.3. Correlation

Diametra PAPP-A assay was compared with a reference immunoassay method. 50 serum samples at low, normal and high level were used.

The linear regression curve is:

$$Y = 0.5519 \cdot X + 1445.5$$

$$(R^2=0.9791)$$

11.4. Specificity

The cross-reactivity of the PAPP-A antibody to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of PAPP-A needed to displace the same amount of labeled analog.

Substance	Cross-reactivity
Free b-HCG	ND
AFP	ND
hPRL	ND
FSH	ND

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Sorensen S. *Clinical Chemistry*. 2011, 57, 1023-1031.
2. Qin QP. *Clinical Chemistry*. 1997, 43, 2323-2332.
3. Fialova L., Malbohan IM. *Bratisl Lek Listy*. 2002, 103, 194-205.
4. Kagan KO. *Ultrasound Obste Gynecol*. 2008, 31, 493-502.
5. Spencer K. *Ultrasound Obste Gynecol*. 1999, 13, 231-237.
6. Baluja-Conde IB. *Rev Biomed*. 2005, 259-271.
7. Smith GCS. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
8. Ong YTC. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2000, 107, 1265-1270.
9. Bischof P. *Archives of Gynecology*. 1979, 227, 315-326

Ed. 04/2016

DCM184-2

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM184-2
Ed. 04/2016

PAPP-A

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa inmuno enzimática del PAPP-A (Proteína Plasmática A asociada al embarazo) en el suero humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO184

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de PAPP-A (Proteína Plasmática A asociada al embarazo) en el suero humano

El dispositivo PAPP-A está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

PAPP-A es una proteína de 740 kDa producida principalmente por la placenta durante el embarazo; esta proteína es normalmente presente en el suero, pero su concentración aumenta en el suero materno conforme progresa el embarazo.

Los niveles de PAPP-A en el suero materno son indicativos de amenaza de aborto, parto prematuro, retardo de desarrollo intra uterino y otros. Diferentes estudios han evidenciado una disminución de la concentración de PAPP-A en caso de trisomías, en particular en el Síndrome de Down (Trisomía 21).

La proteína PAPP-A puede detectarse en el suero en forma de dímero hetero-tetramérico con ProMBP (la forma más importante durante el embarazo), o bien en forma dimerica asociada a patologías cardíacas. El dispositivo PAPP-A Diametra ha sido estudiado específicamente para la detección de la forma hetero-tetramérica. La determinación de la concentración de PAPP-A se basa en el análisis de "Múltiples de Medianas (MoM)" y se presenta como porcentaje de la mediana.

El método de ELISA es la forma más fácil de evaluar la concentración de PAPP-A en suero y comparar los resultados de diferentes laboratorios.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los reactivos requeridos para el ensayo incluyen: anticuerpos de alta afinidad conjugados con enzima, epítopos y antígeno nativo. El antígeno PAPP-A presente en el suero reacciona con el anticuerpo biotilado que a su vez se fija al pozo marcado con estreptavidina. Según la reacción:

BtAb(m) = anticuerpo monoclonal biotilado

Ag_(PAPP-A) = antígeno nativo

Ag_(PAPP-A)-BtAb(m) = complejo antígeno anticuerpo

ka = constante de asociación

k-a = constante de disociación

El complejo se une al pozo según la reacción:

Ag(PAPP-A)-BtAb(m) + estreptavidina C.W. → Complejo inmovilizado (IC)

Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

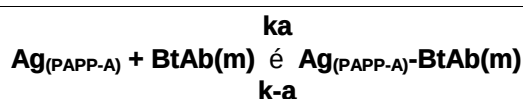
Complejo inmovilizado (IC) = Ag-Ab unido en el pocillo

Tras un período de incubación, la fracción antígeno-anticuerpo unida se separa del antígeno por un lavado.

Se añade otro anticuerpo conjugado con la enzima (con epítopo distinto). De las interacciones se forma un complejo anticuerpo conjugado-antígeno-biotilado-anticuerpo en la superficie de los pocillos.

El exceso de enzima se elimina mediante lavado. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre.

La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.



3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 0.5 mL cada uno)

CAL0 **REF DCE002/18406-0**

CAL1 **REF DCE002/18407-0**

CAL2 **REF DCE002/18408-0**

CAL3 **REF DCE002/18409-0**

CAL4 **REF DCE002/18410-0**

CAL5 **REF DCE002/18411-0**

2. Control (1 frasco, 0.5 mL)

Suero positivo para el PAPP-A.

La concentración de los Controles se indica en la Hoja de Control (Certificate of Analysis)

REF DCE045/18403-0

3. Biotina (Biotin Reagent) (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo monoclonal biotilado anti PAPP-A

REF DCE019/18419-0

4. Conjugado (Enzyme Reagent) (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo monoclonal anti PAPP-A conjugado con HRP

REF DCE002/18402-0

5. Microplaca (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/18403-0

6. Diluyente PAPP-A (1 Frasco, 5 mL)

Solución tampón con suero humano

REF DCE053/18453-0

7. Substrato TMB (1 frasco, 12 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004/18404-0

8. Solución de parada (1 frasco, 8 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005/18405-0

9. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

Solución tampón **REF DCE006/18406-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar. Después de abrirse es estable dos meses a 2-8°C,

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.

- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una

placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.

- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los calibradores se obtuvieron a partir de una sustancia pura de PAPP-A y se diluyeron en suero humano, con las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/L	0	100	500	1500	5000	10000

Una vez abiertos los calibradores son estables 2 meses a 2-8°C.

6.2. Preparación de la muestra

Seguir las buenas prácticas de laboratorio para manipular los productos sanguíneos.

Usar muestras de suero o plasma humano, y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a 2÷8°C durante un período máximo de 48 horas. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,020 mL de la muestra. En caso de muestras con valores superiores a 10000 mIU/L diluir con el diluyente de muestras React. N. 6 en razón de 1:5, a la hora de calcular el resultado tener en cuenta el factor de dilución aplicado.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50X) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la

relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8 °C durante al menos 30 días.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.**
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	10 µL		
Muestra		10 µL	
Biotina (Biotin Reagent)	100 µL	100 µL	
Agitar delicadamente la placa durante 20-30 segundos. Cubrir la placa con la película adhesiva. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lavar los pocillos 5 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
Conjugado (Enzyme Reagent)	100 µL	100 µL	
Cubrir la placa con la película adhesiva. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lavar los pocillos 5 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
No agite la placa despues de añadir el sustrato TMB. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), en la oscuridad.			
Solución de parada	50 µL	50 µL	50 µL
Agitar la microplaca con cuidado durante 15-20 segundos. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar los controles internos a niveles de los rangos bajo, medio y alto para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como muestras desconocidas y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados.

Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis.

Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior.

Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

Para determinar la concentración de PAPP-A se utiliza una curva dosis respuesta.

1. Registrar las OD obtenidas
2. Graficar las OD de cada calibrador en mIU/L en papel milimetrado.
3. Trazar la mejor curva que intercepta todos los puntos.
4. Para determinar la concentración de las muestras intersectar la OD correspondiente sobre la curva y leer sobre el eje X la concentración. En el ejemplo a continuación la OD media de la muestra 0,586 intersecta la curva dosis respuesta en 1240 mIU/L.

Nota: pueden utilizarse software de calculo ELISA siempre que estén validados.

8.1. Ejemplo de calculo

Los valores a continuación deben considerarse como un ejemplo y no deben utilizarse en lugar de los datos experimentales.

Calibrador /Muestra	OD 450 nm	OD media	Valor PAPP-A mIU/L
Cal 0	0.035	0.041	0
	0.046		
Cal 1	0.159	0.152	100
	0.145		
Cal 2	0.302	0.289	500
	0.276		
Cal 3	0.519	0.499	1500
	0.478		
Cal 4	1.052	1.043	5000
	1.033		
Cal 5	2.706	2.665	10000
	2.625		
Campione	0.564	0.586	1240
	0.608		

9. PARAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Respetar los parámetros de aceptación indicados en el Certificado de Analisis, tanto para las OD como para los controles.

10. VALORES DE REFERENCIA

Se aconseja confrontar los valores en base a los multiplos de la mediana (MoM) establecidos por el laboratorio para evaluar las muestras de los pacientes. Dividiendo el valor de la muestra por el MoM se obtiene un valor en porcientos que frecuentemente es utilizado en la evaluación.

De acuerdo con los intervalos establecidos en una población adulta normal, los intervalos para el dispositivo Diametra PAPP-A son:

Semana de Embarazo	PAPP-A Conc. (mIU/L)
9	650
10	1200
11	1700
12	2800
13	3900

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

11. PARAMETROS CARACTERISTICOS

11.1. Precisión

El inter y intra assay han sido determinados con el análisis en tres diferentes pool de sueros control.

Intra assay				
Suero	Media mIU/L	SD	% CV	Replicados
1	383.4	9.66	2.5	24
2	1817.2	65.69	3.6	24
3	4641.1	242.91	5.2	24

Inter assay				
Siero	Media mIU/L	SD	% CV	Replicados
1	381.3	27.54	7.2	10
2	1900.3	97.13	5.1	10
3	4905.0	255.92	5.2	10

11.2. Sensibilidad

La sensibilidad analítica como limite de detección, ha sido calculada determinando la variabilidad del Cal 0 y considerando 2 desviaciones estándar.

La sensibilidad del test es 34 mUI/mL.

11.3. Correlación con método de referencia

El kit Diametra PAPP-A se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 50 muestras de suero. La curva de regresión se ha calculado así:

$$Y = 0,5519 \cdot X + 1445,5$$

$$R^2 = 0,9791$$

11.4. Especificidad

Se ha probado la especificidad del test versus sustancias interferentes.

Interferente	Cross-reactividad
Free b-HCG	ND
AFP	ND
hPRL	ND
FSH	ND

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFIA

1. Sorensen S. *Clinical Chemistry*. 2011, 57, 1023-1031.
2. Qin QP. *Clinical Chemistry*. 1997, 43, 2323-2332.
3. Fialova L., Malbohan IM. *Bratisl Lek Listy*. 2002, 103, 194-205.
4. Kagan KO. *Ultrasound Obste Gynecol*. 2008, 31, 493-502.
5. Spencer K. *Ultrasound Obste Gynecol*. 1999, 13, 231-237.
6. Baluja-Conde IB. *Rev Biomed*. 2005, 259-271.
7. Smith GCS. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
8. Ong YTC. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2000, 107, 1265-1270.
9. Bischof P. *Archives of Gynecology*. 1979, 227, 315-326

Ed. 04/2016

DCM184-2

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15, 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs