

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

PAPP-A ELISA



C €0197



DE52051



96 Wells



Legal Manufacturer:
DRG Instruments GmbH
Frauenbergstraße 18
35039 Marburg

Distributed by / Vertrieb durch:
Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel-Wellsee
Germany

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL.....	10
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	10
10	LIMITATIONS OF USE.....	11
11	LEGAL ASPECTS	12
12	REFERENCES / LITERATURE.....	12
1	EINLEITUNG	13
2	TESTPRINZIP	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	14
5	PROBENVORBEREITUNG.....	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	16
7	ERWARTETE WERTE	18
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	20
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	20
10	GRENZEN DES TESTS	20
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	21
12	REFERENZEN / LITERATUR	21
1	INTRODUZIONE	22
2	PRINCIPIO DEL TEST	22
3	PRECAUZIONI	22
4	COMPONENTI DEL KIT.....	23
5	CAMPIONI.....	25
6	ATTUAZIONE DEL TEST	25
7	VALORI NORMALI	27
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	29
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	29
10	LIMITAZIONE DEL TEST	29
11	ASPETTI LEGALI	30
12	BIBLIOGRAFIA.....	30
1	INTRODUCCIÓN.....	31
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	31
3	PRECAUCIONES	31
4	COMPONENTES DEL KIT	32
5	MUESTRAS.....	34
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	34
7	VALORES ESPERADOS	36
8	CONTROL DE CALIDAD.....	37
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	38
10	LIMITACIONES DE USO.....	38
11	ASPECTOS LEGALES.....	39
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFIA	39
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA'S.....		40

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC PAPP-A ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in serum and plasma

1.2 Summary and Explanation

PAPP-A is a protein produced by the developing placenta. Its concentration in the maternal blood increases rapidly after the 7th week of pregnancy. The measurement of PAPP-A in the first trimester of pregnancy has been reported as a useful marker in antenatal screening for Down Syndrome and other fetal aneuploidies. Reduced PAPP-A values in combination with maternal age, the measurement of free β -HCG and the ultrasonic determination of nuchal translucency (NT) in pregnancy weeks 11 to 14 may detect up to 90 % of pregnancies with Down syndrom (reference 7).

The DEMEDITEC PAPP-A ELISA DE52051 may be used for the risk assessment of Down´s syndrom (trisomy 21) in the first trimester of pregnancy. For the risk assessment of trisomy 21 and other fetal aneuploidies PAPP-A should always be measured in combination with other analytes (for example free β -HCG and NT, see above) and a special software for the risk assessment of trisomy 21. According to the IVD Directive (98/79/EC) both software and kits for the additional analytes must be suitable for trisomy 21 screening and CE-certified by a notified body, indicated by the identification number of the notified body on the CE-mark on software and kits.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDITEC PAPP-A ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a polyclonal anti PAPP-A antibody. An aliquot of patient sample containing endogenous PAPP-A is incubated in the coated well with assay buffer. After incubation the unbound material is washed off. In the second incubation step a sandwich complex is formed with a polyclonal anti PAPP-A antibody peroxidase conjugate. Having added the substrate solution, the intensity of color developed is proportional to the concentration of PAPP-A in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21-26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 1 N acidic solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-PAPP-A antibody (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized), 0.15 mL;
Concentrations: 0; 1; 2.5; 5.0; 15.0; 30.0 µg/mL
Conversion: 1 mU/mL = 4.5 mg/L
The DEMEDITEC PAPP-A Standards are comparable with NEQAS approved Reference material for Down Syndrome Screening (U/L, IRP 76/610)
See „Preparation of Reagents“;
contain 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
3. **Control (low and high)**, 2 vials (lyophilized), 0.15 mL,
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
see „Reagent Preparation“
Contains 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
4. **Assay Buffer**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
contains 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
5. **Enzyme Conjugate 11X concentrate**, 1 vial, 1.5 mL,
complex containing horseradish peroxidase;
see „Preparation of Reagents“.
Contains 0.03% Proclin, 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
6. **Conjugate Diluent**, 1 vial, 14 mL, ready to use
Contains 0.03% Proclin, 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 1 N acidic solution,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“.

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or Deionized water
- Timer (60 min. range).
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 150 µL Aqua dest.

Note: *The reconstituted standards are stable for 2 months at 2-8 °C.*

Control

Reconstitute the lyophilized content with 150 µL Aqua dest. and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the control several times before use.

Note: *The reconstituted control is stable for 2 months at 2-8 °C*

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

Enzyme Conjugate

30 minutes before use dilute 1.0 ml of concentrated Enzyme Conjugate with 10 ml Conjugate Diluent.

Note: *The Enzyme Conjugate has to be **prepared fresh 30 min. before use** and cannot be stored longer than 24 hours. If more than one test run is performed, dilute only the quantity required for each test run.*

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001;
for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001;
for Citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2-8°C prior to assaying.

If EDTA plasma is stored at 2-8°C, it must be assayed within 48 hours.

Specimens held for a longer time (up to two months) should be frozen only once at -20°C prior to assay.

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

All standards, samples, and controls should be run in duplicate. All standards, samples, and controls should be run concurrently so that all conditions of testing are the same

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **10 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Add **100 µl Assay Buffer** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted *Wash Solution* (400 µl). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual water droplets.

Important note:

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Dispense **100 µL** diluted **Enzyme Conjugate** (see "Preparation of Reagents") into each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 3 times with diluted *Wash Solution* (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
10. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
12. Determine the absorbance (OD) of each well at **450±10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted diluted or reported as > 30 µg/mL.. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 µg/mL)	0.18
Standard 1 (1 µg/mL)	0.38
Standard 2 (2.5 µg/mL)	0.56
Standard 3 (5 µg/mL)	0.83
Standard 4 (15 µg/mL)	1.44
Standard 5 (30 µg/mL)	1.80

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

7.1 Pregnant women in the 1st trimester

238 samples of pregnant women in the 1st trimester have been measured with the DEMEDITEC PAPP-A ELISA.

The values are validated in comparison with a Gaussian distribution.

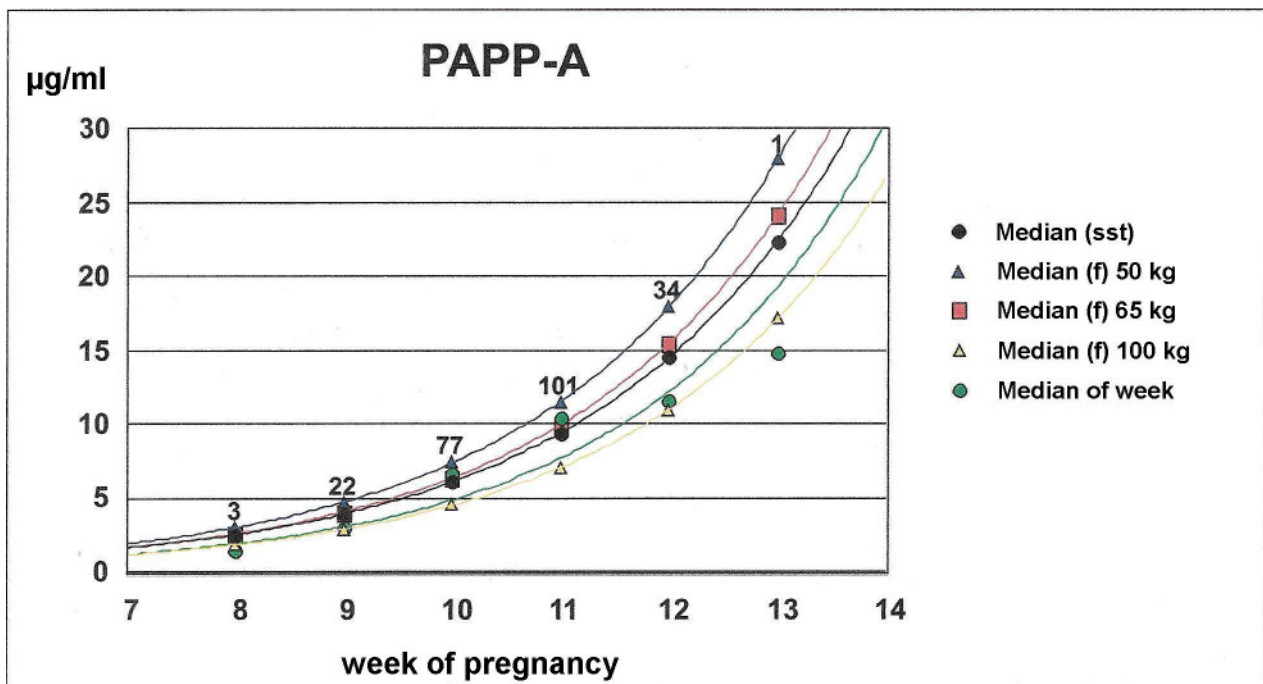
Consideration of body weight and day of gestation results in the following regression equation:

$$\text{Median (f) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.12268 + 0.06324 * \text{gestation day} - 0.00979 * \text{body weight}).$$

If the values of the same 238 pregnant women are compared with the gestation day only (body weight not considered) the following weight independent regression equation is found:

$$\text{Median (sst) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.705444 + 0.0618725 * \text{gestation day}).$$

In the following diagram and table the medians of function (median (f)) for **completed pregnancy weeks 8 to 13** have been calculated for three body weights (50 kg, 65 kg, and 100 kg). For comparison the medians were also determined manually (Median of week) and by using the weight independent regression equation (Median (sst)).



Completed week of gestation	day of gestation	Median(sst) [µg/ml] weight independent	Median (f) [µg/ml] weight 50 kg	Median (f) [µg/ml] weight 65 kg	Median (f) [µg/ml] weight 100 kg	Median of week [µg/ml]
8	59	2.57	3.06	2.6	1.88	1.5
9	66	3.97	4.77	4.1	2.92	3.0
10	73	6.12	7.42	6.4	4.55	6.7
11	80	9.43	11.55	10.0	7.08	10.5
12	87	14.55	17.99	15.5	11.03	11.6
13	94	22.43	28.00	24.2	17.17	14.9

Population and laboratory differences may lead to slightly different medians. Each laboratory should therefore determine and continuously update its own medians from its own patient collective. The regression equations and values in the table should be used as a guideline only. The calculation of medians and/or regression functions for the calculation of medians from own patient data bases should be performed with the applied trisomy 21 risk calculation software. Medians determined for the DEMEDITEC PAPP-A ELISA can not be used with assays of other manufacturers. Medians determined for PAPP-A assays of other manufacturers can not be used with the DEMEDITEC PAPP-A ELISA.

7.1.1 Use for Down Syndrom Screening

For risk calculation in prenatal screening PAPP-A concentrations are indicated as MOM (multiple of medians, MOM = Measured Concentration (PAPP-A) / Median PAPP-A).

In Down syndrom pregnancies the median of MOMs for PAPP-A are increasing during the first trimester and are not distinguishable anymore from normal pregnancies during the second trimester (reference 6, details see table). PAPP-A must therefore be measured in the first trimester of pregnancy (completed weeks 10–13).

Completed week of pregnancy	10	11	12	13	14-20
Median of MOM in pregnancies with Down Syndrom	0,34	0,42	0,50	0,58	1,11

Data from reference 6

For risk calculation of trisomy 21 not only PAPP-A but also other parameters like free β HCG and nuchal translucency (NT) for the 1st trimester and/or AFP, free Estriol and HCG for the 2nd trimester have to be determined.

The use of these parameters for risk calculation of trisomy 21 requires a special software. **According to the IVD Directive (98/79/EC) both software and kits for the additional analytes must be suitable for trisomy 21 screening and CE-certified by a notified body, indicated by the identification number of the notified body on the CE-mark on software and kits. The software must allow the calculation of medians from own patient measurements.**

It is imperative to take into consideration additional factors, e.g. age of the woman, weight, ethnic group and smoker/non-smoker. **An underestimation of the gestation age can lead to a falsely high calculated risk (false positive).** To reduce this source of error, it is important to **determine the gestation age as precisely as possible. Gestation age calculation from the last menstrual cycle inheres a high risk of variation.**

Sonographic determination of the crown-rump length (CRL) or biparietal diameter (BIP) is recommended for the proper determination of the gestation age.

PAPP-A measurement in the course of a prenatal screening determines only a risk for trisomy 21.

For proof of trisomy 21 genetic determinations are required.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.133 µg/mL – 30 µg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The antibody used for the DEMEDITEC PAPP-A ELISA is specific for human PAPP-A. There is no cross-reactivity to other species.

No reaction is seen with normal human plasma.

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Standard 0* and was found to be 0.133 µg/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (µg/mL)	CV (%)
1	20	1.12	2.89
2	20	10.17	2.81

9.4.2 Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (µg/mL)	CV (%)
1	12	1.18	7.18
2	12	10.94	5.72

9.5 Recovery

Sample	Added Conc. (µg/mL)	Measured Conc. (µg/mL)	Expected Conc. (µg/mL)	Recovery (%)
1	--	19.89	19.89	100
	1.25	10.94	11.20	97.7
	2.50	12.00	12.45	96.4
	7.50	17.66	17.45	101.2
	15.00	24.78	24.95	99.3
2	--	2.17	2.17	100
	1.25	2.44	2.34	104.3
	2.50	3.44	3.59	96.0
	7.50	9.00	8.59	104.8
	15.00	15.77	16.09	98.1

9.6 Linearity

Sample	Dilution	Mean Conc. (µg/mL)	Recovery (%)
1	None	20.90	100
	1:2	10.30	98.5
	1:4	5.39	103.1
	1:8	2.61	100.0
	1:16	1.25	95.8
2	None	11.83	--
	1:2	5.80	98.1
	1:4	2.82	95.3
	1:8	1.45	98.1
	1:16	0.73	98.8

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of PAPP-A in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 300 µg/mL of PAPP-A.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Spencer K., Scouter V., Tul N., Snijders R., Nicolaides K.H. Ultrasound Obstet Gynecol. 1999; 13:1-7
2. Sancken U.
Deutsches Ärzteblatt 97 3.März 2000, Heft 9:A532-A537
3. Bayes-Genis A., Conover C.A., Overgaard M.T., et al.
N. Engl. J. Med., Vol.345, No.14, 2001: 1022-1029
4. Schaeffer H.-J., Sancken U., Eiben B., Opper C., Jung A.
Fetal Diagn Ther. 2001; 16: 437-464
5. Qiu-Ping Q., Christiansen M., Oxvig C., Pettersson K., Sottrup-Jensen L., Koch C., Norgaard-Pedersen B.
Clinical Chemistry 43:12, 1997; 2323-2332
6. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM. Health Technol Assess. 2003; 7(11). First and second trimester antenatal screening for Down's Syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS).
7. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. Ultrasound Obstet Gynecol. 2002 Sep;20(3): 219-25. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies.

1 EINLEITUNG

Der **DEMEDITEC PAPP-A ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung des Pregnancy associated plasma Protein A (PAPP-A) in Serum und Plasma eingesetzt.

PAPP-A wird in der sich entwickelnden Plazenta produziert. Die PAPP-A Konzentration im mütterlichen Blut steigt nach der 7. Schwangerschaftswoche schnell an. Die Bestimmung von PAPP-A im ersten Trimenon der Schwangerschaft ist als ein nützlicher Marker für das pränatale Screening auf Down Syndrom und anderer Aneuploidien beschrieben worden. Erniedrigte PAPP-A Konzentrationen konnten in Verbindung mit der Messung von freiem β -HCG und der sonografischen Bestimmung der Nackentransparenz (NT) in den Schwangerschaftswochen 11 – 14 bis zu 90 % der Schwangerschaften mit Down Syndrom erkennen (Referenz 7).

Der DEMEDITEC PAPP-A ELISA DE52051 ist für die Risikoabschätzung von Trisomie 21 (Down Syndrom) im ersten Trimenon der Schwangerschaft geeignet. Die Risikoabschätzung von Trisomie 21 und anderer Aneuploidien sollte nur in Verbindung mit zusätzlichen Testverfahren (z.B. freies β -HCG und NT, s. oben) und einer speziellen Software, erfolgen. Gemäss der IVD Direktive 98/79/EG müssen sowohl die Software als auch die zusätzlichen Testverfahren für die Ermittlung des Trisomie 21 Risikos geeignet - und durch eine benannte Stelle (Notified body) entsprechend CE-zertifiziert sein (angezeigt durch die Angabe der Nummer der benannten Stelle auf dem CE Symbol).

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC PAPP-A ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet. Die Proben, die endogenes PAPP-A enthalten inkubieren zusammen mit einem Assaypuffer in den beschichteten Wells. Ungebundene Material wird durch Waschen der Wells entfernt.

In einem zweiten Inkubationsschritt wird ein Sandwichkomplex mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Anti-PAPP-A-Antikörper gebildet. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der PAPP-A-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Teskit enthaltene, Arbeitsanleitung.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 1 N saure Lösung enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-PAPP-A-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen (lyophilisiert), je 0,15 mL;
Konzentrationen: 0; 1; 2.5; 5.0; 15.0; 30.0 µg/mL
Umrechnungsfaktor: 1 mU/mL = 4.5 mg/L
Die DEMEDITEC PAPP-A Standards sind vergleichbar mit dem von NEQAS anerkannten Referenzmaterial für Down Syndrome Screening (U/L, IRP 76/610)
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält 0,015% BND und 0,010% MIT als Konservierungsstoff.
3. **Control (low and high)** (Kontrolle), 2 Fläschchen (lyophilisiert), je 0,15 mL;
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält 0,015% BND und 0,010% MIT als Konservierungsstoff.
4. **Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
Enthält 0,015% BND und 0,010% MIT als Konservierungsstoff.
5. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) **11X konzentriert**, 1 Fläschchen, 1,5 mL;
Komplex, mit Meerrettichperoxidase konjugiert ,
siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält 0,3% Proclin, 0,015% BND und 0,010% MIT als Konservierungsstoff.
6. **Conjugate Diluent** (Konjugatverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig.
Enthält 0,3% Proclin, 0,015% BND und 0,010% MIT als Konservierungsstoff.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 1 N saure Lösung ,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter),
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 150 µL destilliertem Wasser.

Achtung: Bei 2-8 °C sind die rekonstituierten Standards 2 Monate haltbar.

Control

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt des Fläschchens mit 150 µL destilliertem Wasser und lassen Sie das Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch die Kontrolle mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Bei 2-8 °C ist die rekonstituierte Kontrolle 2 Monate haltbar.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

Enzyme Conjugate

30 Minuten vor Gebrauch 1.0 ml Enzyme Conjugate-Konzentrat mit 10 ml Conjugate Diluent vermischen.

*Achtung: Das Enzymkonjugat **muß 30 Minuten vor Gebrauch frisch zubereitet werden** und darf nicht länger als 24 Stunden gelagert werden. Wenn mehr als ein Testlauf durchgeführt wird, verdünnen Sie nur die Menge, die für jede Testdurchführung benötigt wird.*

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulantien enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

(z.B. für EDTA-Plasma Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;
für Heparinplasma Sarstedt Monovette – oranger Deckel - # 02.165.001;
für Zitratplasma Sarstedt Monovette – grüner Deckel - # 02.167.001.)

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2-8°C gelagert werden.

EDTA-Plasma sollte bei Lagerung bei 2-8°C spätestens nach 48 Stunden gemessen werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20°C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchgemischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

Alle Standards, Proben und Kontrollen sollten gleichzeitig in Doppelbestimmung durchgeführt werden, so dass alle Testbedingungen gleich sind.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 10 µL Standards, Control** und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µl Assay Buffer** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütten.
Alle Wells 3 Mal mit 400 µl Wash Solution waschen. Verbleibende Wassertropfen durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL verdünntes Enzyme Conjugate** (siehe „Vorbereitung der Reagenzien“) in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter *Wash Solution* waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
10. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
12. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 µg/mL)	0.18
Standard 1 (1 µg/mL)	0.38
Standard 2 (2.5 µg/mL)	0.56
Standard 3 (5 µg/mL)	0.83
Standard 4 (15 µg/mL)	1.44
Standard 5 (30 µg/mL)	1.80

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

7.1 Schwangere Frauen im 1. Trimester

Die Proben von 238 schwangeren Frauen im 1. Trimester wurden mit dem DEMEDITEC PAPP-A ELISA gemessen und die Ergebnisse durch Vergleich mit einer Gauss'schen Normalverteilung validiert.

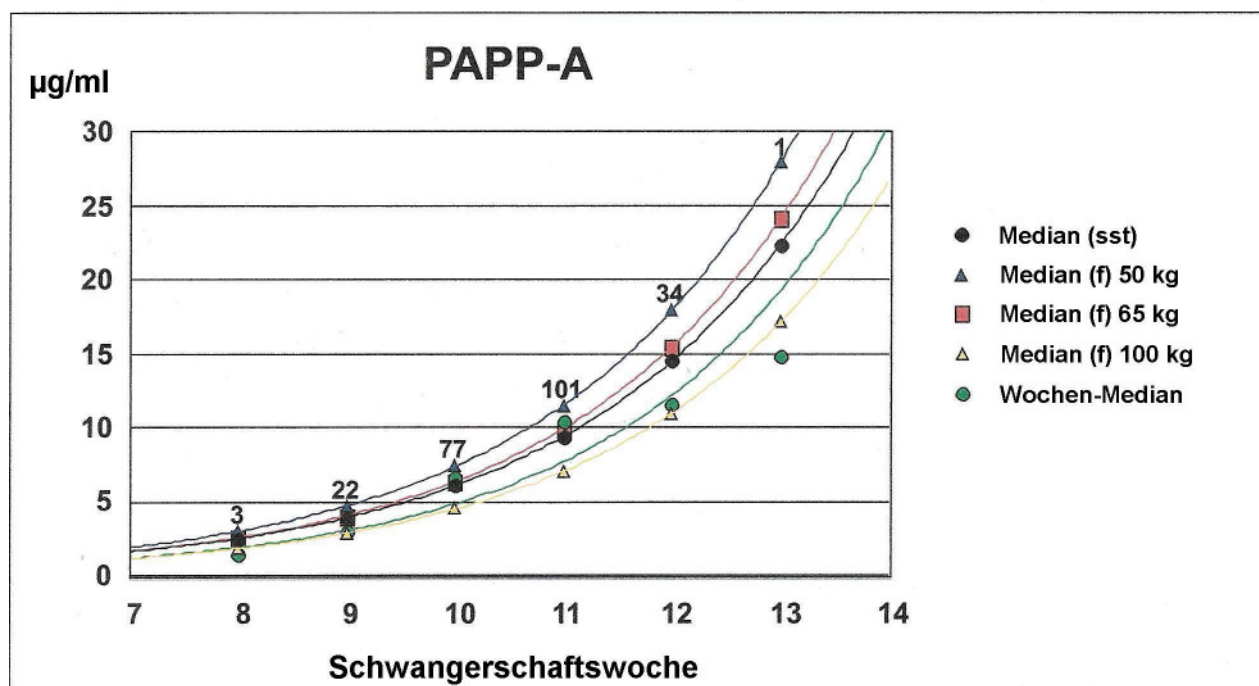
Unter Berücksichtigung des Gewichtes und des Gestationstages ergibt sich folgende Regressionsfunktion:

$$\text{Median (f) PAPP-A} = \text{EXP} (-2,12268 + 0,06324 * \text{Gestationstag} - 0,00979 * \text{Körpergewicht}).$$

Unter ausschliesslicher Berücksichtigung des Gestationstages (Körpergewicht nicht berücksichtigt) ergibt sich für die gleichen 238 Seren die folgende gewichtsunabhängige Regressionsfunktion:

$$\text{Median (sst) PAPP-A} = \text{EXP} (-2,705444 + 0,0618725 * \text{Gestationstag}).$$

In der folgenden Grafik und Tabelle wurden die Funktions-Mediane (Median (f) für die **abgeschlossenen Schwangerschaftswochen** 8 bis 13 für drei Körpergewichte (50 kg, 65 kg (durchschnittliches Körpergewicht) und 100 kg) berechnet. Zum Vergleich wurden die Mediane zusätzlich mit der gewichtsunabhängigen Regressionsfunktion (Median (sst)) berechnet und manuell bestimmt (Wochen-Median).



Abgeschlossene Schwangerschaftswoche	Gestationstag	Median(sst) [µg/ml] gewichts-unabhängig	Median (f) [µg/ml] 50 kg Gewicht	Median (f) [µg/ml] 65 kg Gewicht	Median (f) [µg/ml] 100 kg Gewicht	Wochen-Median [µg/ml]
8	59	2,57	3,06	2,6	1,88	1,5
9	66	3,97	4,77	4,1	2,92	3,0
10	73	6,12	7,42	6,4	4,55	6,7
11	80	9,43	11,55	10,0	7,08	10,5
12	87	14,55	17,99	15,5	11,03	11,6
13	94	22,43	28,00	24,2	17,17	14,9

In unterschiedlichen Populationen und Laboratorien können leicht abweichende Mediane auftreten. Jedes Labor sollte daher aus dem eigenem Patientenkollektiv eigene Mediane bestimmen und diese fortlaufend aktualisieren. Die in der Tabelle angegebenen Werte sowie die Regressionsgleichungen sollten nur als Anhaltspunkt verwendet werden. Die Berechnung von Medianen oder Regressionsgleichungen sollte über die verwendete Risikoermittlungssoftware erfolgen. Für den DEMEDITEC PAPP-A ELISA ermittelte Mediane können nicht mit PAPP-A Assays anderer Hersteller verwendet werden. Mediane, die für Assays anderer Hersteller ermittelt wurden, können nicht für den DEMEDITEC PAPP-A ELISA verwendet werden.

7.1.1 Einsatz für die Risikoeinschätzung des Down Syndroms

Für die Risikoberechnung im pränatalen Screening werden die PAPP-A Konzentrationen als MOM-Werte (multiple of medians) angegeben: $MOM = \text{gemessene PAPP-A Konzentration} / \text{Median PAPP-A}$. Bei Schwangerschaften mit Down Syndrom steigen die Mediane der MOMs während des ersten Trimenons stetig an und sind im zweiten Trimenon nicht mehr unterscheidbar von normalen Schwangerschaften (Referenz 6, Details sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben). PAPP-A muss daher während des ersten Trimenons bestimmt werden.

Abgeschlossene Schwangerschaftswoche	10	11	12	13	14-20
Median der MOMs in Schwangerschaften mit Down Syndrom	0,34	0,42	0,50	0,58	1,11

Werte sind Referenz 6 entnommen

Neben der Bestimmung des PAPP-A müssen zur Risikoermittlung von Trisomie 21 weitere Parameter wie freies β hCG und die Nackentransparenz (NT) für das 1. Trimester und/oder AFP, freies Estriol und hCG im 2. Trimester bestimmt werden.

Der Einsatz dieser Parameter für die Risikoberechnung erfordert eine spezielle Software. **Gemäss der IVD Direktive 98/79/EG müssen sowohl die Software als auch die oben genannten zusätzlichen Testverfahren für die Ermittlung des Trisomie 21 Risikos geeignet - und durch eine benannte Stelle (Notified body) entsprechend CE-zertifiziert sein (angezeigt durch die Angabe der Nummer der benannten Stelle auf dem CE Symbol). Die Software muss die Berechnung von Medianen aus eigenen Messwerten unterstützen.** Bei der Berechnung des Trisomie 21-Risikos mit der CE-konformen Software müssen unbedingt weitere Faktoren wie Alter der Frau, Gewicht, ethnische Zugehörigkeit und Raucherin/Nichtraucherin Berücksichtigung finden. **Da sich die Konzentrationen der für den Triple-Test eingesetzten Serumparameter während des Untersuchungszeitraumes ändern, kann eine Überschätzung des Schwangerschaftsalters (Schwangerschaftsdauer) zu einem zu hoch eingeschätzten Risiko („Falsch Positiv“) führen.** Um diese Fehlerquelle zu reduzieren, ist es wichtig, das Gestationsalter so präzise wie möglich zu bestimmen. Die Bestimmung des Gestationsalters aus der letzten Regelblutung ist mit einem hohen Variationsrisiko behaftet. Für eine möglichst genaue Bestimmung des Gestationsalters wird die sonographische Bestimmung der Scheitel-Steiss Länge (SSL) oder des Biparietaldurchmessers (BPD) empfohlen.

Die Bestimmung von PAPP-A im Zuge eines Pränatalscreenings erlaubt lediglich die Ermittlung eines Risikos für Trisomie 21.

Der Nachweis von Trisomie 21 kann nur über genetische Methoden erfolgen.

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,133 µg/mL – 30 µg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Der für den DEMEDITEC PAPP-A ELISA eingesetzte Antikörper ist spezifisch für humanes PAPP-A. Es gibt keine Kreuzreaktion mit verschiedenen anderen Spezies.

Es zeigt sich keine Reaktion mit normalem menschlichen Plasma.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 0,133 µg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Präzision

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des PAPP-A-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 300 µg/mL PAPP-A nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC PAPP-A ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di proteina plasmatica A associata alla gravidanza (PAPP-A) in siero e plasma.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

PAPP-A è una proteina prodotta dalla placenta in sviluppo.

La sua concentrazione nel sangue materno nel primo trimestre di gravidanza cresce rapidamente dopo la settima settimana di gravidanza.

La determinazione di PAPP-A nel primo trimestre di gravidanza è stata riportata come un marker utile per il screening prenatale per la Sindrome di Down e altre aneuploidie fetali.

Valori bassi di PAPP-A in combinazione con l'età materna, la misura di β -HCG libero e la determinazione ultrasonica della translucenza nucale (NT) nella settimana 11 a 14 di gravidanza permettono di individuare fino a 90 % delle gravidanze con sindrome di Down (referenza 7).

Il test DEMEDIATEC PAPP-A ELISA DE52051 può essere usato per la determinazione del rischio per la sindrome di Down (trisomia 21) nel primo trimestre di gravidanza.

Per la determinazione del rischio di trisomia 21 e di altre aneuploidie fetali, il PAPP-A dovrebbe sempre essere determinato in combinazione con altri analiti (per esempio β -HCG libero e NT, vedi sopra) e usando una software speciale per la valutazione del rischio di trisomia 21.

In accordo con le direttive IVD (98/79/EC), la software e i test kit per analiti aggiuntivi devono essere idonei per il screening di trisomia 21 e certificati CE da un ente responsabile, indicando il numero di identificazione sul timbro CE su software e test kits.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DEMEDIATEC PAPP-A ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo policlonale

Un aliquota del campione del paziente contenente PAPP-A endogeno è incubato nei pozzetti ricoperti insieme al tampone d'analisi. Dopo l'incubazione il materiale non legato viene lavato via.

In un secondo passaggio di incubazione, si forma un complesso a sandwich con un anticorpo policlonale anti PAPP-A coniugato alla perossidasi (tracciante enzimatico).

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di PAPP-A nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 1 N acido solforico. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU 91/155 EC.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti- PAPP-A anticorpo (policlonale)
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 flaconi (liofilizzati), 0,15 mL; Concentrazione: 0; 1; 2.5; 5.0; 15.0; 30.0 µg/mL
Conversione: 1 mU/mL = 4.5 mg/L
Gli Standard DEMEDITEC PAPP-A sono comparabili con il materiale di riferimento approvato da NEQAS per il screening della syndrome di Down (U/L, IRP 76/610)
Vedi "preparazione dei reagenti".
Contiene 0.015% BND e 0.010% MIT come conservante.
3. **Control (low and high)**, (Controllo), 2 flaconi (liofilizzati), 0,15 mL
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
vedi „preparazione dei reagenti“
Contiene 0.015% BND e 0.010% MIT come conservante.
4. **Assay Buffer** (Tampone del test), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso
Contiene 0.015% BND e 0.010% MIT come conservante.
5. **Enzyme Conjugate Concentrate 11X** (tracciante enzimatico concentrato 11X), 1 flacone, 1,5 mL, Complesso contenente la perossidasi di rafano,
vedi „preparazione dei reagenti“.
* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND e 0,010% MIT come conservante.
6. **Conjugate Diluent** (Diluente del tracciante), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND e 0,010% MIT come conservante.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 1 N acido soluzione.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
vedi „preparazione dei reagenti“.

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli standard con 150 µL acqua distillata.

Nota: *Gli standard ricostituiti sono stabili per 2 mesi a 2 °C a 8 °C.*

Control

Ricostituire il contenuto liofilizzato con 150 µL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti.

Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: *Il controllo ricostituito è stabile per 2 mesi a 2 °C a 8 °C.*

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

Enzyme Conjugate

30 minuti prima dell'uso diluire 1.0 mL del concentrato del tracciante enzimatico (Enzyme Conjugate) con 10 mL del diluente del coniugato (Conjugate Diluent).

Nota: *Il tracciante enzimatico deve essere **preparato 30 min. prima dell'uso** e non può essere conservato oltre 24 ore. Se più di un test viene eseguito, diluire la quantità necessaria.*

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, Eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

(P.es. per EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001;
per eparina plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001;
per citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 °C a 8 °C.

EDTA-plasma magazzinato a 2 °C a 8 °C deve essere usato per l'analisi entro 48 ore.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a due mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20°C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

Tutti gli standard, i campioni e i controlli dovrebbero essere eseguiti contemporaneamente in doppio, in modo che tutte le condizioni sono uguali.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **10 µL** di ogni **Standard, Control** e **campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Assay Buffer** in ogni pozzetto
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
6. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto. (Vedi "preparazione dei reagenti".)
7. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
8. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
9. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
10. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
11. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
12. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altri funzioni usati per l'elaborazioni dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 µg/mL)	0.18
Standard 1 (1 µg/mL)	0.38
Standard 2 (2.5 µg/mL)	0.56
Standard 3 (5 µg/mL)	0.83
Standard 4 (15 µg/mL)	1.44
Standard 5 (30 µg/mL)	1.80

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

7.1 Donne gravide nel primo trimestre

238 campioni di donne gravide nel primo trimestre sono stati analizzati con il DEMEDITEC PAPP-A ELISA. I valori sono validati comparando con la distribuzione di Gauss.

L'influenza del peso corporeo e del giorno di gestazione risulta nella seguente equazione di regressione:

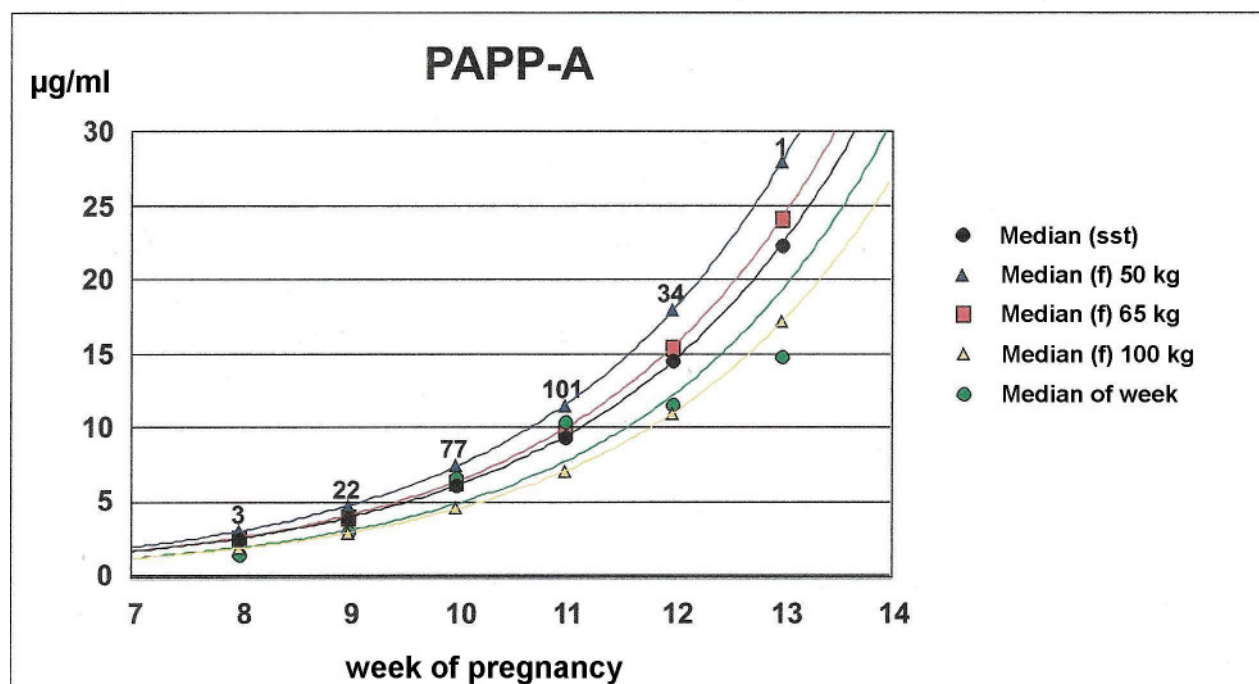
$$\text{Mediano (f) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.12268 + 0.06324 * \text{giorno di gestazione} - 0.00979 * \text{peso corporeo}).$$

Se i valori dei stessi 238 campioni di donne gravide sono comparati con il solo giorno di gestazione (non considerando il peso corporeo), la seguente regressione peso-indipendente e' trovato:

$$\text{Mediano (sst) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.705444 + 0.0618725 * \text{giorno di gestazione}).$$

Nel seguente diagramma e tabella i valori mediani di funzione (mediano (f) per le **settimane complete di gravidanza** 8 a 13 sono stati calcolati per tre pesi corporei (50 kg, 65 kg (peso medio) e 100 kg).

Per un confronto, i mediani sono stati determinati manualmente (mediano di settimana) e usando l'equazione di regressione peso-indipendente (mediano (sst)).



Settimana completata di gravidanza	Giorno di gestazione	Valore mediano [µg/ml] di peso indipendente	Valore mediano (f) [µg/ml] di peso 50 kg	Valore mediano (f) [µg/ml] di peso 65 kg	Valore mediano (f) [µg/ml] di peso 100 kg	Mediano di settimana [µg/ml]
8	59	2.57	3.06	2.6	1.88	1.5
9	66	3.97	4.77	4.1	2.92	3.0
10	73	6.12	7.42	6.4	4.55	6.7
11	80	9.43	11.55	10.0	7.08	10.5
12	87	14.55	17.99	15.5	11.03	11.6
13	94	22.43	28.00	24.2	17.17	14.9

Differenze tra popolazioni e laboratory possono portare a valori mediani leggermente diversi. Ogni laboratorio deve determinare e continuamente aggiornare i propri valori mediani dal proprio pool di pazienti.

L'equazione di regressione e i valori nella tabella devono servire soltanto come valori guida.

Il calcolo dei mediani e/o delle funzioni di regressioni per il calcolo dei mediani da dati di pazienti propri dovrebbe essere eseguito usando un software per la valutazione di rischio di trisomia 21.

I mediani determinati per il DEMEDITEC PAPP-A ELISA non possono essere usati per i test prodotti da altri produttori.

I mediani determinati con test di PAPP-A di altri produttori non possono essere usati per il DEMEDITEC PAPP-A ELISA.

7.1.1 Uso per il screening della syndrome di Down

Per il calcolo del rischio nel screening prenatale, le concentrazioni di PAPP-A sono indicate come MOM (multipli dei mediani, ; $MOM = \text{Concentrazione misurata di PAPP-A} / \text{Mediano PAPP-A}$).

In gravidanze con syndrome di Down, i mediani di MOM per PAPP-A crescono durante il primo trimestre e non si distinguono più da quelli di gravidanze normali durante il secondo trimestre (referenza 6, dettagli vedi tabella).

I livelli di PAPP-A devono pertanto essere misurati nel primo trimestre di gravidanza (settimane completate 10-13).

Settimana completata di gravidanza	10	11	12	13	14-20
Mediano di MOM in gravidanze con syndrome di Down	0,34	0,42	0,50	0,58	1,11

Data da nota bibliografica 6

Per il calcolo del rischio di trisomia 21 non soltanto il PAPP-A, ma anche altri parametri come β HCG e la translucenza nucale (NT) per il primo trimestre e/o AFP, estriolo libero e HCG per il secondo trimestre devono essere determinati.

L'uso di questi parametri per il calcolo del rischio di trisomia 21 richiede un software speciale.

In accordo con le direttive IVD (98/79/EC), la software e i test kit per analiti aggiuntivi devono essere idonei per il screening di trisomia 21 e certificati CE da un ente responsabile, indicando il numero di identificazione sul timbro CE su software e test kits. La software deve permettere di calcolare i mediani da dati propri di pazienti.

E' obbligatorio di prendere in considerazione fattori aggiuntivi, p.es. l'età delle donne, il peso, il gruppo etnico e il fatto di essere fumatrice/non-fumatrice. **Una sottostima della durata di gestazione può portare a un rischio calcolato falsamente alto (falsi positivi).** Per ridurre i fonti di errore, e' importante **determinare la durata della gestazione più precisamente possibile. La durata di gestazione calcolata dall'ultimo ciclo mestruale porta inerentemente un alto rischio di variazione.**

Si raccomanda **la determinazione sonografica della lunghezza crown-rump (CRL) o del parametro biparietale (BIP)** per la determinazione accurata della durata di gestazione.

La misura di PAPP-A nel corso di un screening prenatale determina il rischio di trisomia 21 soltanto.

Per la prova di trisomia 21, si richiede la determinazione genetica.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzino e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,133 µg/mL – 30 µg/mL

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Gli anticorpi usati per il DEMEDITEC PAPP-A ELISA sono specifici per PAPP-A umano. Non esiste reattività ad incrocio con alter specie.

Non si osserva alcuna reazione con plasma umano normale.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,133 µg/mL.

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manomissione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di PAPP-A nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 300 µg/mL di PAPP-A.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento. Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

El **kit enzimático de inmunoensayo DEMEDITEC PAPP-A** suministra las herramientas para la determinación cuantitativa de la proteína plasmática A asociada a embarazo (PAPP-A) en suero y en plasma.

PAPP-A es una proteína producida por la placenta en desarrollo. Su concentración en la sangre materna aumenta rápidamente después de la séptima semana de embarazo. Se ha documentado que la medida de PAPP-A en el primer trimestre de embarazo es un marcador útil en la exploración para Síndrome de Down u otras aneuploidias del feto. Unos valores reducidos de PAPP-A en combinación con la mayor edad de la madre, las medidas de β -HCG libre y la determinación por ultrasonidos de la translucidez de la nuca (TN) en las semanas de embarazo 11 a 14, pueden detectar más del 90% de embarazos con Síndrome de Down (referencia 7).

El kit DEMEDITEC PAPP-A ELISA DE52051 puede utilizarse para la valoración del riesgo de Síndrome de Down (trisomía del 21) en el primer trimestre de embarazo. Par la valoración del riesgo de trisomía del 21 y otras aneuploidias del feto, la PAPP-A debe siempre medirse en combinación con otros analitos (por ejemplo, β -HCG libre y TN, ver arriba) además del uso de un software específico para la valoración del riesgo de trisomía del 21. De acuerdo con la directiva (98/79/EC) tanto el software como los kits para los analitos adicionales deben ser adecuados para la búsqueda de la trisomía del 21 y certificados por la CE por un Organismo Notificado, indicando el número identificador del Organismo Notificado en la marca CE en el software y los kits.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DEMEDITEC PAPP-A ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foci antigénico en una molécula de PAPP-A. Se incubaba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene PAPP-A endógena en los pocillos recubiertos con el tampón de ensayo. Después de la incubación el material no unido se lava.

En un segundo paso se forma un complejo sándwich. Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de PAPP-A en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aquí en el kit
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene acide solucion 1 N. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a Demeditec Diagnostics GmbH.

Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de la guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- PAPP-A (policlonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales (lío filizados), 0.15 mL; Concentraciones: : 0; 1; 2.5; 5.0; 15.0; 30.0 µg/mL
Conversión: 1 mU/mL = 4.5 mg/L
Los estándares DEMEDITEC PAPP-A son comparables con NEQAS, material de referencia aprobado para la evaluación de Síndrome de Down (U/L, IRP 76/610)
Ver "Preparación de los Reactivos";
contiene 0.015% BND en 0.010% MIT como conservante.
3. **Control (low and high)**, 2 vial (lío filizado), 0.15 mL,
ver "Preparación de los Reactivos"
Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
contiene 0.015% BND en 0.010% MIT como conservante.
4. **Assay Buffer** (Tampón de ensayo), 1 vial, 25 mL, listo para usar,
contiene 0.015% BND en 0.010% MIT como conservante.
5. **Enzyme Conjugate 11X concentrate** (Conjugado enzimático, 11X), 1 vial, 1.5 mL,
Contiene la Peroxidasa de rábano;
ver "Preparación de los Reactivos"
Contiene 0.03% Proclin, 0.015% BND en 0.010% MIT como conservante.
6. **Conjugate Diluent** (Solución para dilución del conjugado), 1 vial, 14 mL, listo para usar
Contiene 0.03% Proclin, 0.015% BND en 0.010% MIT como conservante.
7. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
Tetrametilbencidina (TMB).
8. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
contiene acide solución 1 N
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
9. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X),
ver "Preparación de los Reactivos".

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bromonitrodioxano)
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (Metilisotiazolona)

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450±10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2-8°C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2-8°C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2-8°C.

Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Standards

Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los estándares con 150 µL de agua destilada.

Nota: Los estándares reconstituidos son estables durante 2 meses a 2-8°C.

Control

Reconstituir el contenido liofilizado con 150 µL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar el control varias veces antes de usar.

Nota: El control reconstituido es estable durante 2 meses a 2-8°C.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.

La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

Enzyme Conjugate

Diluir 1,0ml del concentrado del enzima conjugado con 10 mL del diluyente del conjugado 30 minutos antes de usar.

Nota: El enzima conjugado ha de **prepararse fresco 30 minutos antes de su uso** y no puede almacenarse más de 24 horas. Si se llevan a cabo más de un ensayo, diluir solamente la cantidad requerida para cada ensayo.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Heparina o citrato).

No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

(Ej. Para plasma EDTA Sarstedt Monovette – tapa roja - # 02.166.001;
para plasma Heparina Sarstedt Monovette – tapa naranja - # 02.165.001;
para plasma Citrato Sarstedt Monovette – tapa verde - # 02.167.001.)

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2-8°C antes del ensayo.

Si el plasma-EDTA se almacena a 2-8°C, debe ensayarse en 48 horas.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 2 meses) han de congelarse sólo una vez a -20°C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)
b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Todos los estándares, muestras y controles deben de ensayarse en duplicado para que todas las condiciones de ensayo sean las mismas. Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **10 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de *Assay Buffer* a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 3 veces con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante:
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* diluida (ver "Preparación de los Reactivos") a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
8. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 3 veces con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
9. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
10. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
11. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
12. Leer la OD a **450±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y no pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 µg/mL)	0.18
Standard 1 (1 µg/mL)	0.38
Standard 2 (2.5 µg/mL)	0.56
Standard 3 (5 µg/mL)	0.83
Standard 4 (15 µg/mL)	1.44
Standard 5 (30 µg/mL)	1.80

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus propios valores normales y anómalos.

7.1 Mujeres embarazadas en el primer trimestre

Se midieron 238 muestras de mujeres embarazadas en el primer trimestre con el DEMEDITEC PAPP-A ELISA.

Los valores se han validado en comparación con una distribución Gausiana.

La consideración del peso corporal y el día de gestación resulta en la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Mediana (f) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.12268 + 0.06324 * \text{día de gestación} - 0.00979 * \text{peso corporal}).$$

Si se comparan los valores de las muestras de las mismas 238 mujeres embarazadas solo con el día de gestación (sin considerar el peso corporal), se tiene la siguiente ecuación de regresión independiente del peso:

$$\text{Mediana (sst) PAPP-A} = \text{EXP} (-2.705444 + 0.0618725 * \text{día de gestación}).$$

En el siguiente diagrama y tabla, se han calculado las medianas de la función (mediana (f)) para **los embarazos completados en las semanas 8 a 13** para tres pesos corporales (50 kg, 65 kg (media de pesos corporales), y 100 kg). Para la comparación las medianas se determinaron también manualmente (mediana de la semana) y mediante el uso de la ecuación de regresión independiente del peso (Mediana (sst)).

Semana Completa de gestación	Día de gestación	Mediana (sst) [µg/ml] Independiente del peso	Mediana (f) [µg/ml] Peso 50 kg	Mediana (f) [µg/ml] Peso 65 kg	Mediana (f) [µg/ml] Peso 100 kg	Mediana de semana [µg/ml]
8	59	2.57	3.06	2.6	1.88	1.5
9	66	3.97	4.77	4.1	2.92	3.0
10	73	6.12	7.42	6.4	4.55	6.7
11	80	9.43	11.55	10.0	7.08	10.5
12	87	14.55	17.99	15.5	11.03	11.6
13	94	22.43	28.00	24.2	17.17	14.9

Diferencias en la población y el laboratorio pueden llevar a ligeras diferencias en las medianas. Cada laboratorio debe pues determinar y actualizar continuamente sus propias medianas de su colectivo de pacientes. Las ecuaciones de regresión y los valores de la tabla deben utilizarse solo como una directriz. El cálculo de las medianas y/o las funciones de regresión para el cálculo de las medianas de las bases de datos de sus propios pacientes deben realizarse con el software aplicado para cálculo del riesgo de la trisomía del 21. Las medianas determinadas por el DEMEDITEC PAPP-A ELISA no pueden ser utilizadas con ensayos de otros fabricantes. Las medianas determinadas por los ensayos PAPP-A de otros fabricantes no pueden utilizarse con el DEMEDITEC PAPP-A ELISA.

7.1.1 Utilización de la búsqueda del Síndrome de Down

Para el cálculo del riesgo en la búsqueda prenatal, las concentraciones de PAPP-A están indicadas como MOM (múltiplo de medianas, $MOM = \text{Concentración medida (PAPP-A)} / \text{Mediana PAPP-A}$).

En los embarazos con síndrome de Down, la mediana de MOMs para PAPP-A aumentan durante el primer trimestre y no son distinguibles más tarde de los embarazos normales durante el Segundo trimestre (referencia 6, ver detalles en la tabla). PAPP-A debe medirse en el primer trimestre de embarazo (semanas 10-13).

Semana de embarazo	10	11	12	13	14-20
Mediana de MOM en embarazos con Síndrome de Down	0,34	0,42	0,50	0,58	1,11

Datos de la referencia 6

Para el cálculo del riesgo de la trisomía del 21 se deben determinar además de PAPP-A otros parámetros como β -HCG libre y la translucidez de la nuca (TN) para el primer trimestre y/o AFP, estriol libre y HCG para el Segundo trimestre.

El uso de estos parámetros para el cálculo de la trisomía del 21 requiere un software especial. **De acuerdo con la directiva IVD (98/79/EC) tanto el software como los kits para los análisis adicionales deben ser adecuados para la búsqueda de la trisomía del 21 y certificados por la CE por un Organismo Notificado, indicado por el número de identificación del Organismo Notificado en la marca CE en el software y los kits. El software debe permitir el cálculo de las medianas para las medidas de los pacientes propios.**

Es imperativo el tener en consideración factores adicionales, por ejemplo, edad de la mujer, peso, grupo étnico y ser fumadora/no fumadora. **Una subestimación de la edad de gestación puede llevar a un cálculo de alto riesgo falso (falso positivo).** Para reducir la fuente de este error, es importante **determinar la edad de gestación lo más precisamente posible. El cálculo de la edad de gestación del último ciclo menstrual agrega un alto riesgo de variación.** Se recomienda la **determinación sonográfica de la longitud cefalococcígea (CRL) o el diámetro biparietal (BIP)** para la determinación adecuada de la edad de gestación.

La medida de PAPP-A en el curso de una búsqueda prenatal determina solamente un riesgo para la trisomía del 21.

Para probar la trisomía del 21 se requiere la determinación genética.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,133 µg/mL – 30 µg/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

El anticuerpo usado para el DEMEDITEC PAPP-A ELISA es específico para la PAPP-A humana. No existe reactividad cruzada con otras especies.

No se ha observado reacción con el plasma humano normal.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 0.133 µg/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de PAPP-A en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 300 µg/mL de PAPP-A.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFIA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA'S

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante