Версия 2013.01

**Кат. № PF1201-K**

**Только для диагностики ин-витро**

**Тест-система для определения Пресепсина PATHFAST**

**(PATHFAST™ Presepsin)**

**60 определений**

*Предназначение*

Тест-система для определения Пресепсина (PATHFAST Presepsin) предназначена для ин-витро диагностики на анализаторе PATHFAST и служит для количественного определения концентрации пресепсина (sCD14-ST) в цельной крови и плазме. Результат анализа используется для помощи в диагностике и прогнозе развития сепсиса, для оценки тяжести сепсиса и стратификации риска критических пациентов с сепсисом.

*Описание*

CD14 – это гликопротеин, который экспрессируется на поверхности мембраны моноцитов/макрофагов (mCD14) и служит рецептором для комплексов липополисахаридов (ЛПС) и ЛПС-связывающего белка (LPBP). mCD14 локализуется на поверхности клеток вместе с toll-подобным рецептором 4 (TLR4). После связывания LPBP чужеродных с чужеродными липополисахаридами CD14 активирует TLR4-специфичный провоспалительный сигнальный каскад, и тем самым запускает воспалительную реакцию организма против инфекционных агентов. Комплекс LPS-LPBP-CD14 высвобождается в кровь путем диссоциации CD14 от клеточной мембраны с образованием растворимого CD14 (sCD14). Однако, за счет активности протеаз плазмы образуется и другой тип молекул sCD14 - молекула, которая носит название sCD14 подтипа ST (sCD14-ST), или пресепсин1. Уровни пресепсина значительно выше у пациентов с сепсисом, нежели у пациентов с ССВО (синдром системного воспалительного ответа) или у практически здоровых людей1,2. Один из механизмов секреции пресепсина связан с процессом фагоцитоза и расщепления микроорганизмов ферментами лизосом3. В крови у кроликов с перевязкой и проколом слепой кишки (Cecal Ligation and Puncture)4 уровни пресепсина повышаются одновременно с появлением бактерий в крови и раньше, чем уровни интерлейкина 6 (IL-6) и Д-димера.

Определение концентрации пресепсина может быть полезным не только для диагностики и прогноза исхода сепсиса, но и для мониторинга течения заболевания и ответа на терапевтическое вмешательство5,6.

Тест-система для определения Пресепсина является анализом для измерения пресепсина в формате хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (CLEIA). В тесте используются моноклональные и поликлональные антитела против пресепсина. Все необходимые для проведения тестирования компоненты упакованы в одном картридже. После загрузки картриджа в диагностический анализатор PATHFAST количественный результат может быть получен через 17 минут.

*Важные замечания:*

Результаты, полученные в этом тесте всегда следует оценивать в свете клинической картины и в сочетании с другими важными клиническими данными.

*Состав набора*

1. Картриджи с реагентами: 60 картриджей (6 х 10 уп.).

Картридж с реагентами состоит из 16 лунок. Все лунки кроме лунки для пробы (№1) и счетной лунки (№10) запечатаны алюминиевой фольгой со штрих-кодом. Каждая лунка картриджа заполнена реагентами для тестирования.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Лунки | Форма | Состав | Коли-чество | Источник |
| №2 | Жидкая | Щелочная фосфатаза,  конъюгированная с PoAb\* к пресепсину в  MES\*\* Буфере с  Натрия азидом | 50 мкл  < 0,1% | Микробная  Кроличьи |
| №7 | Жидкая | MoAb\*\*\* к пресепсину на магнитных частицах в  MES Буфере | 50 мкл | Мышиные |
| №13 | Жидкая | Хемилюминесцентный субстрат CDP-Star® | 100 мкл |  |
| №11 | Жидкая | Буфер для разведения образцов в составе:  Трис-буфер с  Натрия азидом | 25 мкл  < 0,1% |  |
| №3, 4, 5 | Жидкая | Промывочный буфер в составе:  MOPS\*\*\*\* буфер с  Натрия азидом | 400 мкл  < 0,1% |  |

№№ 1, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16 – пустые лунки

\*PoAb - поликлональные антитела

\*\*MES - 2-морфолиноэтансульфоновая кислота, моногидрат

\*\*\*MoAb - моноклональные антитела

\*\*\*\*MOPS - 3-морфолинопропансульфоновая кислота

CDP-Star® - зарегистрированная торговая марка Applied Biosystems

2. Калибратор 1 (CAL-1) 1 флакон x 2,0 мл (жидкий)

3. Калибратор 2 (CAL-2) 2 флакона для 1,2 мл (лиофилизированный)

4. Разбавитель для калибратора 2 флакона x 1,2 мл (жидкий)

(с натрия азидом 0,05%)

5. Карта эталонной калибровки (MC Entry Card) 1 штука

6. Инструкция 1 штука

7. Паспорт контрольных значений 1 штука

*Необходимые материалы и оборудование*

Анализатор PATHFASTTM и расходные материалы

Пресепсин Контроль PATHFAST, кат. № PF0201-C.

*Принцип анализа*

Процедура проведения анализа основана на методе хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (CLEIA) с использованием технологии MAGTRATION®. В этой процедуре поликлональные антитела к пресепсину, связанные со щелочной фосфатазой, и моноклональные антитела к пресепсину на магнитных частицах смешиваются с пробой. Пресепсин из пробы связывается с антителами к нему, образуя иммунокомплекс с мечеными ферментом антителами и антителами на магнитных частицах. После удаления несвязавшегося материала к иммунному комплексу добавляется хемилюминесцентный субстрат. После короткой инкубации под воздействием ферментной реакции в смеси начинается люминесценция, интенсивность которой зависит от концентрации пресепсина в пробе. Расчет результата проводится по стандартной калибровочной кривой.

\*MAGTRATION® - технология разделения B/F (связанного/свободного материала) с промывкой магнитных частиц в наконечниках. Технология является зарегистрированной торговой маркой Precision System Science.

*Меры предосторожности*

Картриджи с реагентами:

1. Не использовать реагенты по окончании срока хранения.
2. Не использовать картриджи повторно, это одноразовые расходные материалы.
3. Не снимать алюминиевую фольгу с картриджа.
4. Держать картридж только за край и не касаться пальцами алюминиевого покрытия и черной счетной лунки.
5. Не пользоваться поврежденными картриджами.
6. Не использовать реагенты, хранившиеся при комнатной температуре.
7. Избегать попадания слюны в черную счетную лунку.
8. Избегать загрязнения реагентов и их экспозиции на прямом солнечном свету.
9. При некоторых условиях хранения и транспортировки может наблюдаться слипание алюминиевого покрытия картриджей. Если такое наблюдается, аккуратно разделите картриджи на столе.
10. Азид натрия, содержащийся в реагентах, может вступать в реакцию с медью и свинцом в водопроводных системах с образованием взрывоопасных солей. Содержание этого вещества в реагентах крайне мало, но, тем не менее, при утилизации азид-содержащих материалов, они должны смываться большим количеством воды.
11. Утилизировать отходы в соответствии с национальными правилами утилизации биологических отходов. Соблюдать общие меры предосторожности и обращаться со всеми компонентами как с потенциально инфекционными агентами.

*Условия хранения*

Хранить при +2 +8ºС. Не открывать картридж до использования.

*Срок хранения*

Срок хранения указан на картридже, коробках с картриджами и упаковке.

*Сбор проб*

1. Использовать цельную кровь или плазму, собранные стандартной процедурой в пробирки с гепарином или ЭДТА. Не использовать для анализа сыворотку крови.
2. Пробы цельной крови должны быть проанализированы в течение 4 часов после сбора. Непосредственно перед внесением пробы цельной крови в лунку на картридже, следует аккуратно смешать кровь в пробирке (не использовать вихревой смеситель вортекс). Немедленно после внесения пробы нужно загрузить картридж в прибор и начать тестирование.
3. Перед использованием пробы следует убедиться, что она не содержит фибриновых нитей и других нерастворимых частиц, в противном случае образец необходимо осветлить центрифугированием или фильтрацией.
4. Пробы плазмы можно хранить до 3 дней при +2 - 8°C и до 9 месяцев при –20°C или ниже. Если тестирование не предполагается проводить в течение 3 дней, образцы плазмы следует заморозить при –20°C или ниже. Размороженные образцы не замораживать повторно.
5. Образцы перед внесением следует осторожно перемешать (не использовать вихревой смеситель вортекс).
6. Размороженные образцы и образцы, хранившиеся более 12 часов необходимо отцентрифугировать при 2500 - 3000 g в течение 10 минут перед тестированием.

*Подготовка реагентов и проведение анализа*

*Подготовка реагентов*

1. Картридж с реагентами

Готов к использованию.

1. Калибратор 1 (CAL-1)

Готов к использованию.

1. Калибратор 2 (CAL-2)

Восстановить каждый флакон калибратора 2 при помощи содержимого одного флакона разбавителя для калибратора. Восстановленный калибратор может храниться до 24 часов при +2+8°C и до 6 месяцев при –20°C и ниже. Калибратор нельзя замораживать повторно.

Примечание:

1. Используйте одинаковые лоты калибратора 1, калибратора 2, разбавителя для калибратора и картриджей с реагентами. Никогда не смешивайте разные лоты реагентов.
2. Калибратор 2содержит бычий сывороточный альбумин (БСА). Обращаться с осторожностью, избегать контакта с кожей.

*Установка основной калибровочной кривой*

1. Установка основной калибровочной кривой проводится каждый раз при начале использования нового лота реагентов.
2. Установка основной калибровочной кривой производится путем считывания карты эталонной калибровки (MS ENTRY CARD), вложенной в упаковку, с помощью ручного считывателя штрих-кодов для PATHFAST. Подробную процедуру см. в руководстве пользователя для прибора.

*Пользовательская калибровка*

1. Проведение пользовательской калибровки необходимо каждый раз при начале использования нового лота реагентов. Калибровка делается после установки основной калибровочной кривой по карте эталонной калибровки.
2. Пользовательскую калибровку необходимо обновлять каждые 4 недели после проведения первой калибровки (карта эталонной калибровки для этого не нужна).
3. Должны быть протестированы оба калибратора в дублях. Следовательно, для проведения калибровки требуются 4 картриджа, два для калибратора 1 и два для калибратора 2.
4. Установите реагентные картриджи в кассету для картриджей на приборе, потом внесите примерно по 100 мкл калибратора 1 и калибратора 2 в лунки для проб, установите в гнезда для наконечников на приборе новые наконечники напротив картриджей, опустите крышку и запустите прибор в режиме калибровки. Крышка автоматически заблокируется, и начнется тестирование. Через 17 мин результат будет выведен на дисплей и на печать. Подробности процедуры см. в руководстве пользователя для прибора.
5. Откройте крышку, удалите картриджи и наконечники в отходы.

*Контроль качества*

1. Контроль качества проводится после каждой калибровки для того, чтобы проверить калибровочные кривые и сохранить контрольные данные для контроля качества анализов. Контроль качества обязателен для гарантии точности результатов. После каждой калибровки, в каждой новой партии реагентов, или всякий раз, когда необходимо проверить точность результатов, нужно сравнить два уровня контрольных материалов с известными уровнями пресепсина (sCD14-ST).
2. Правила GLP (Надлежащей лабораторной практики) рекомендуют использование соответствующего контроля качества. Для контроля качества рекомендуется соблюдать положения федеральных, областных и местных правил. Если контроль не проводится надлежащим образом, не используйте результаты тестов. Повторите тест или обратитесь к вашему авторизованному дистрибьютору PATHFAST для технической поддержки.

*Процедура тестирования проб*

1. В качестве пробы используйте гепаринизированную или ЭДТА цельную кровь или плазму. Не использовать сыворотку.
2. Установите картридж с реагентами в кассету для картриджей на приборе, потом внесите примерно 100 мкл пробы в лунку для проб на картридже, установите в гнездо для наконечников на приборе новый наконечник напротив картриджа, опустите крышку и запустите прибор кнопкой «Start». Подробности процедуры см. в руководстве пользователя для прибора. Результат будет выведен на дисплей и на печать.
3. Откройте крышку, удалите картриджи и наконечники в отходы.

Примечания:

1. Если тестируется цельная кровь, непосредственно перед внесением пробы в лунку на картридже следует осторожно смешать кровь в пробирке (не использовать вихревой смеситель вортекс). Немедленно после внесения пробы нужно загрузить картридж в прибор и начать тестирование.
2. Если пробы начинают тестироваться после более чем 5-минутной выдержки после внесения пробы в лунку, может быть получен заниженный результат в крови из-за ее осаждения и завышенный результат в плазме из-за ее концентрирования.
3. При использовании цельной крови ввод значения гематокрита пробы является дополнительной опцией в PATHFAST. Подробности процедуры см. в руководстве пользователя для прибора.
4. Пробы с концентрацией пресепсина >20 000 пг/мл следует развести физраствором и протестировать повторно для получения точного результата. При этом необходимо учитывать коэффициент разведения. Если такая точность не нужна, можно указать результат, как >20 000 пг/мл.

*Ожидаемые уровни*

*Референтный диапазон*

В первом исследовании было обнаружено, что референтные уровни пресепсина не зависят от возраста и пола. Концентрацию пресепсина определяли в пробах ЭДТА-плазмы 230 практически здоровых лиц.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Возраст:** | **Все** | **<30 лет** | **30-39 лет** | **40-49 лет** | **> 50 лет** |
| Среднее | 155 | 152 | 158 | 146 | 164 |
| С.О. \* | 54,2 | 54,5 | 38,7 | 48,4 | 66,7 |
| Медиана | 145 | 141 | 150 | 136 | 152 |
| 95 перцентиль | 327 | 332 | 270 | 265 | 346 |
| Количество обследованных | 230 | 55 | 46 | 63 | 66 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Пол:** | **Все** | **Мужчины** | **Женщины** |
| Среднее | 155 | 152 | 156 |
| С.О. \* | 54,2 | 54,4 | 54,1 |
| Медиана | 145 | 142 | 148 |
| 95 перцентиль | 327 | 328 | 318 |
| Количество обследованных | 230 | 126 | 104 |

\* С.О. - среднее отклонение

Второе исследование проводилось на 119 пробах ЭДТА-плазмы от практически здоровых лиц. Уровень пресепсина находился в диапазоне от 60 до 365 пг/мл со среднеарифметическим значением 160 пг/мл; 95% CI (148-171 пг/мл). 5-ая перцентиль составляла 92 пг/мл (95% CI 79-100 пг/мл), а 95-я перцентиль - 320 пг/мл (95 % CI 233-363 пг/мл). ROC-анализ показал отрезной «cut off» уровень в 337 пг/мл для дискриминации между здоровыми лицами и пациентами с сепсисом.

**Распределение уровней пресепсина у здоровых лиц (кол-во = 119)**



Частота

Пресепсин (пг/мл)

Примечание:

Ожидаемые/референтные уровни могут варьировать в зависимости от лаборатории и местности и зависеть от многих факторов. Поэтому каждой лаборатории следует устанавливать свои собственные референтные уровни. Уровни пресепсина повышаются при клинически значимых микробных инфекциях и продолжают расти с увеличением тяжести заболевания3,5. Однако, в зависимости от индивидуальной иммунной реакции и клинической ситуации, при одной и той же инфекции могут наблюдаться разные концентрации пресепсина. Таким образом, врачи должны интерпретировать результаты в свете других лабораторных данных и клинической картины заболевания и в контексте клинической ситуации пациента. Поэтому контрольные диапазоны приведены только для ориентировки.

*Прогностическое значение пресепсина*

У больных с подозрением на сепсис, у которых впоследствии разился сепсис, были определены уровни пресепсина в начале заболевания и просчитана корреляция с 30-дневной смертностью. Анализ выживаемости по Каплану-Мейеру в течение 30 дней после поступления в больницу показал, что пациенты со значениями пресепсина при госпитализации в самой высокой квартили (>1 858 пг/мл) имели риск смертности >60% (р = 0,0005), в то время как пациенты со значениями пресепсина в нижней квартили имели риск смертности на 20% ниже.

Дни

Выживаемость, %



На рисунке ниже представлены результаты ROC анализа прогноза смертности при уровнях пресепсина на момент госпитализации и через 24 и 72 часа соответственно. Прогностическая ценность уровней пресепсина на момент госпитализации и спустя 72 часа была примерно одинаковой (AUC = 0,929).

Специфичность



Чувствительность

*Специфические рабочие характеристики теста*

1. Диапазон результатов: 20-20 000 пг/мл.
2. Корреляция между результатами по цельной крови и плазме

y=1,04x – 10,8, r=0,986, n=104

(y – ЭДТА цельная кровь, x - ЭДТА плазма)

y=1,02x + 28,6, r=0,980, n=104

(y – гепаринизированная цельная кровь, x - ЭДТА плазма)

y=1,01x + 26,9, r=0,983, n=104

(y – гепаринизированная плазма, x - ЭДТА плазма)

1. Стандартизация

Калибраторы для пресепсина были получены с помощью аминокислотного анализа10.

1. Точность измерений

Воспроизводимость определялась с помощью настоящего метода на 4 контрольных материалах по следующему протоколу: каждый из четырех проб плазмы исследовался в дублях в течение 20 случайных дней. Внутритестовые и общие стандартные отклонения рассчитывались по протоколу NCCLS, документ EP5-A2 [ISBN 1-56238-542-9]. Были получены следующие результаты.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Образец | Среднее (пг/мл) | Внутритестовая точность | | Межтестовая точность | |
| С.О. (пг/мл) | К.В. (%) | С.О. (пг/мл) | К.В. (%) |
| Контроль очень низкого уровня | 445 | 19,8 | 4,4 | 19,4 | 4,4 |
| Контроль низкого уровня | 882 | 25,9 | 2,9 | 35,0 | 4,0 |
| Контроль среднего уровня | 4 801 | 154 | 3,2 | 183 | 3,8 |
| Контроль высокого уровня | 19 292 | 753 | 3,9 | 956 | 5,0 |

С.О. – стандартное отклонение, К.В. – коэффициент вариации.

1. Аналитическая чувствительность: < 20 пг/мл.

Установлена как концентрация нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения выше среднего значения нулевого калибратора.

1. Предел определения: < 57,1 пг/мл.

Установлен как наименьшая концентрация, которая может последовательно определяться в тесте с коэффициентом вариации 10%.

1. Хук-эффект высокой дозы.

Не наблюдается до концентрации пресепсина 4 000 000 пг/мл.

1. Аналитическая специфичность.

Следующие вещества не оказывают существенного перекрестного влияния на результат теста при указанных концентрациях:

sCD14 (4,0 мкг/мл) не обнаружено

*Возможные взаимодействия*

Как было обнаружено, следующие вещества в нижеуказанных концентрациях оказывали влияние менее 10% на результаты тестирования.

Свободный билирубин 40 мг/дл

Связанный билирубин 40 мг/дл

Триглицериды, липемия пробы 1000 мг/дл

Гемоглобин (при гемолизе) 600 мг/дл

Ревматоидный фактор 500 МЕ/мл

Ацетаминофен 20 мг/дл

Ацетилсалициловая кислота 65,2 мг/дл

Аллопуринол 4,0 мг/дл

Ампициллин 5,3 мг/дл

Аскорбиновая кислота 6,0 мг/дл

Атенолол 1,0 мг/дл

Кофеин 10 мг/дл

Каптоприл 5,0 мг/дл

Дигоксин 0,61 мкг/дл

Допамин 65 мг/дл

Эритромицин 20 мг/дл

Фуросемид 6,0 мг/дл

Метилдопа 2,5 мг/дл

Нифедипин 6,0 мг/дл

Фенитоин 10 мг/дл

Теофиллин 25 мг/дл

Верапамил 16 мг/дл

Белок (альбумин) 6 г/дл

Имипенем 2,0 мг/дл

Цефотаксим 200 мг/дл

Ванкомицин 4,0 мг/мл

Норадреналин 4,0 мкг/мл

Добутамин 25 мкг/мл

Гепарин 100 МЕ/мл

ЭДТА 2,0 мг/мл

*Ограничения процедуры*

1. Система оповещения об ошибках в приборе содержит кодовые обозначения ошибок для предупреждения персонала о неисправностях. Любой отчет об ошибке, содержащий такие коды, должен быть сохранен.
2. Пробы пациентов могут содержать гетерофильные антитела, которые могут вступать в иммунную реакцию и таким образом влиять на результаты, как завышая, так и занижая их. Этот тест был разработан так, чтобы минимизировать такие влияния. Тем не менее, полная защита от такого влияния не может быть гарантирована. Результат теста, не согласующийся с общей клинической картиной и анамнезом должен интерпретироваться с осторожностью.
3. Результаты теста на пресепсин должны оцениваться в контексте полных лабораторных данных и клинической картины. Если лабораторные результаты не согласуются с клинической картиной и анамнезом пациента, нужно провести дополнительные тесты.

*Ссылки*

1. Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, Takahashi T, Furusako S. Establishment of one-step ELISA detecting Presepsin (sCD14-ST): a new marker for sepsis. Clin Chem Lab Med. 2010 Submitted for publication.
2. Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, Takahashi G, Miyata M, Furusako S, Endo S. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. J Infect Chemother. 2005 Oct; 11(5): 234-8.
3. Naitoh K, Shirakawa K, Hirose J, Nakamura M, Takeuchi T, Hosaka Y, Furusako S, The new sepsis marker, sCD14-ST (PRESEPSIN), induction mechanism in the rabbit sepsis models. SEPSIS 2010: P19.
4. Nakamura M, Takeuchi T, Naito K, Shirakawa K, Hosaka Y, Yamasaki F, Furusako S. Early elevation of plasma soluble CD14 subtype, a novel biomarker for sepsis, in a rabbit cecal ligation and puncture model. Critical Care 2008, 12 (Suppl 2) :P194 (doi:10.1186/cc6415).
5. Kojika M, Takahashi G, Matsumoto N, Kikkawa T, Hoshikawa K, Shioya N, Shibata S, Suzuki Y, Aoki H, Shirakawa K, Endo S. Serum levels of soluble CD14 subtype reflect the APACHE II and SOFA Scores. Medical Postgraduates 2010 Jan; 48(1): 46-50.
6. Takahashi G, Suzuki Y, Kojika M, Matsumoto N, Shozushima T, Makabe H, Yamada Y, Shioya N, Shibata S, Shirakawa K, Endo S. Evaluation of responses to IVIG therapy in patients with severe sepsis and septic shock by soluble CD14 subtype monitoring. Medical Postgraduates 2010 Jan; 48(1): 19-24.
7. The results of Japanese clinical study for PATHFAST Presepsin.
8. The results of Europian clinical sudy for PATHFAST Presepsin.
9. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55.
10. The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition (JP15): Supplement II, Amino Acid Analysis of Proteins, 1814-1822.

***Символы***

|  |  |
| --- | --- |
|  | Соответствие европейским требованиям |
|  | Для ин-витро диагностики |
|  | Номер лота |
|  | Каталожный номер продукта |
|  | Производитель |
|  | Уполномоченный представитель |
|  | Содержимого достаточно для |
|  | Температурные ограничения |
|  | Срок хранения |
|  | Обратите внимание на справочную документацию |
|  | Следуйте инструкции |
|  | Калибратор 1 |
|  | Калибратор 2 |
|  | Разбавитель для калибратора |
|  | Карта эталонной калибровки |

\* PATHFASTTM – LSI Medience Corporation.