

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА CA242

101-10, CanAg CA242 EIA

Каталог. №: 101-10

Методика від 06-2014

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics,
Inc., (Швеція)



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

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg CA242 EIA призначений для кількісного визначення ракового антигену CA242 в сироватці крові.

ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазним, неконкурентним методом, заснованим на прямій технології "сендвіч". Стандарти та зразки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-CA242 моноклональними антитілами в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. У процесі інкубації антиген CA242, що міститься в стандартах або зразках пацієнтів, адсорбується на покритих стрептавідином лунках мікропланшетів з біотинильованим анти-CanAg Mab. Смужки потім промиваються і інкубуються з пероксидазою хрому, міченою анти-CA242 Mab. Після промивання в кожну лунку додається буферний субстрат/хромогенний реагент (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції в присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену CA242, присутньому у зразку.

Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що не обов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація CA242 в зразках пацієнта розраховується з калібрувальної кривої.

РЕАГЕНТИ

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °C. Не заморожуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упакуваннях і зберігаються і використовуються, як описано. негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °C) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °C до закінчення терміну придатності
Калібратори CA242	5 флаконів x 0.75 мл, 0-15-50-100-150 Од/мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності

Антиген людського CA242 в фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, інертний жовтий барвник і 0.05% NaN₃ в якості консерванту. Готові до використання.

Контролі CA242	2 флакона x 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності
----------------	---------------------	--

Антиген людського CA242 в фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, 0.05% NaN₃ в якості консерванту. Готові до використання.

Біотинильований Анти-CA242	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
----------------------------	------------------	--

Біотинильоване Анти-CA242 моноклональне мишаче антитіло, ~ 1.5 мкг/мл. Містить Tris-HCl буферний сольовий розчин (pH 7.75), бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, детергент, інертний червоний барвник і 0.05% NaN₃ в якості консерванту. Готовий до використання.

Трейсер, HRP-мічений анти-CA242	1 флакон x 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-CA242 моноклональними мишачими антитілами, ~ 40 мкг/мл. Містить консерванти. Перед використанням повинен бути розведений Розчинником для Трейсера.

Розчинник для Трейсера	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------------	------------------	--

Забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH 7.2) з бичачим сироватковим альбуміном, бичачим імуноглобуліном, блокуючими агентами, миючим засобом, інертним синім барвником і 0.01% метил-ізотіазолоном (MIT) в якості консерванта. Готовий до використання.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон x 12 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Сток-розчин	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	------------------	--

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивального буфера	1 флакон x 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить TPIC-HCl сольовий розчин з ТВІН 20 і Germall II як консервант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

Ознаки нестабільності

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для використання в in-Vitro діагностиці:

- Дотримуйтесь інструкцій у листку-вкладиші. Надійність результатів аналізу не може бути гарантована, якщо є якісь відхилення від інструкції.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Реагенти містять азид натрію (NaN₃) в якості консерванту. Азид натрію може вступати в реакцію зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів.
- При знищенні змити з великою кількістю води, щоб запобігти азидного нарощування.
- Дотримуйтесь місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

Увага

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

Набір розроблений для використання сироватки. Зберіть кров з вени і відокремте сироватку, дотримуючись загальноприйнятих процедур. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C протягом 24 годин. Для тривалого часу зберігайте зразки при -20 °C або нижче. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі

2-8 °C протягом ночі, а потім привести зразки до кімнатної температури перед аналізом.

ПРОЦЕДУРА

Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікропланшетний шейкер

Струшування має бути середнім або енергійним, приблизно 700-900 коливань/хв.

2. Пристрій для промивання мікропланшета

Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1, 3 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати 8-канальну піпетку для ручного промивання.

3. Мікропланшетний Рідер

З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.

4. Точні піпетки

З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мікролітрах і мілілітрах.

5. Дистильована або деіонізована вода

Для приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

1. Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору CA242 EIA. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.

2. Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °C) перед використанням. Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-28 °C для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'яко, але ретельно перемішані обережним перевертанням флаконів після відтавання.

3. Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.

4. Вимога ефективної і ретельної промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукувати нею по фільтрувальному паперу.

- Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо належного очищення та обслуговування і проводьте необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Рекомендується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переповнення* з об'ємом заповнення 800 мкл. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.

5. Субстрат TMB-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності TMB HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).

6. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином TMB-субстрату HRP.

герметичному контейнері

Приготуйте потрібний об'єм Робочого Розчину Трейсера змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-CA242 з 1 мл Розчинника для Трейсера на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трејсер, HRP Anti-CA242 (мкл)	Розчинника для Трейсера (мл)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Робочого Розчину Трейсера.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-CA242 у флакон з Розчинником для Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трејсер, HRP Anti-CA242 повністю перелитий у флакон з Розчинником для Трейсера.

ПРИМІТКА: Робочий розчин Трейсера стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °C. Не готуйте більш Робочого розчину Трейсера, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролю і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-28 °C).

1. Приготуйте Промивний Розчин і Робочий розчин Трейсера. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
2. Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збираєтеся використовувати протягом 30 хвилин.
3. Внесіть 25 мкл CA242 Калібраторів (CAL 0, 15, 50, 100, 150), Контролів (C1, C2) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. 0	Кал. 150	Невід. 2		
B	Кал. 0	Кал. 150	Невід. 2		
C	Кал. 15	C1	1 т.д.		
D	Кал. 15	C1			
E	Кал. 50	C2			
F	Кал. 50	C2			
G	Кал. 100	Невід. 1			
H	Кал. 100	Невід. 1			

4. Додайте 100 мкл Біотину Анти-CA242 в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми-канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
5. Інкубуйте пластину на протязі 2 годин (± 10 хвилин) при кімнатній температурі (20-28 °C) з постійним перемішуванням планшета на шейкері для мікропланшета.
6. Після першої інкубації видаліть рідину і промийте кожну смужку 3 рази, використовуючи процедуру промивання, описану в п.4.
7. Додайте 100 мкл Робочого розчину Трейсера в кожну лунку. Використовуйте ту ж техніку піпетування як і в пункті 4 вище.
8. Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-28 °C) з постійним потрушуванням.
9. Після другої інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів, використовуючи процедуру промивання, описану в пункті 4.
10. Додайте 100 мкл субстрату TMB в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунку не перевищував 5 хвилин.
11. Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
12. негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °C в герметичному контейнері

Налийте 50 мл промивного концентрату в чисту посудину і розбавте в 25 разів додаванням 1200 мл дистильованої або деіонізованої води для отримання буферного розчину для промивання.

Трасер Робочий розчин	3 тижні при 2-8 °C в
-----------------------	----------------------

Альтернативний варіант

Якщо в лабораторії немає рідера з фільтром на 620 нм, оптична щільність може бути визначена як описано нижче:

Альт 12. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

Діапазон вимірювання

CA242 EIA вимірює концентрації між 1 і 150 Од/мл. Якщо концентрація CA242 вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з нормальною людською сироваткою перед аналізом. **УВАГА:** сироватка, використовувана для розбавлення, також повинна бути виміряна з метою визначення ендогенної концентрації CA242 (див. "Розрахунок результатів").

Контроль якості

CA242 Контролі 1 і 2 слід використовувати для перевірки кожної серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо результати аналізу в недейсних результатах Калібратора чи Контролю, необхідно провести повну перевірку реагентів, точність піпеток, планшетний вошер і роботу зчитувача, і повторити аналіз. Кожна лабораторія може також підготувати свої власні пули сироваток різних рівней, які можуть бути використані в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

Референсний матеріал

Оскільки не існує міжнародного референсного стандарту для антигену CA242, значення калібраторів даного набору CA242 були встановлені по набору внутрішніх стандартів виробника.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з CA242 калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів CA242 рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.
- Метод згладженої кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 слід використовувати як бланк.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.

ПРИМІТКА: 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися.

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (A), отриманих для кожного CA242 калібратора проти відповідної концентрації CA242 (в Од/мл). Невідомі концентрації CA242 потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

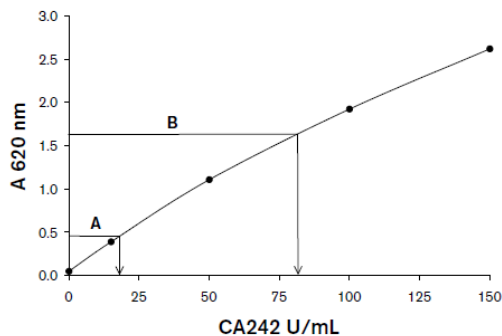
Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні CA242 вище, ніж 150 Од/мл, зразки необхідно розвести 1/10 з нормальною людською сироваткою і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію CA242. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути проаналізований з метою визначення ендогенної концентрації CA242.

Концентрація CA242 з нерозведеному зразку обчислюється таким чином:

Розведення 1/10: $10x [CA242]_{\text{розвед. зразок}} - (0.9x [CA242]_{\text{нормальна сироватка}})$

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (Од/мл)	Середнє абс. значення (A)	CA242 Од/мл
Калібратор 0	0	0.050	
Калібратор 15	15	0.390	
Калібратор 50	50	1.107	
Калібратор 100	100	1.922	
Калібратор 150	150	2.617	
Зразок A		0.410	16.1
Зразок B		1.636	80.9



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні CA242 не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір CA242 не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і CA242-тест не повинен замінювати інші клінічні дослідження. Анти-реагентні антитіла (як анти-мишачі антитіла (НАМА) або Гетерофільні антитіла) в зразках пацієнта можуть іноді впливати на результати дослідження, незважаючи на додавання специфічних блокуючих агентів в буфер.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Концентрації CA242 були визначені цим набором в 184 сироватках (97 жінок і 87 чоловіків) здорових пацієнтів. Діапазон склав $8,5 \pm 7,6$ Од/мл. Нижня і верхня межі нормального діапазону оцінювалися згідно з рекомендаціями IFCC для непараметричного статистичного аналізу та визначені як 2,5% (нижній) і 97,5% (верхній) фрактали. Референс-інтервал визначений як 95%.

Fraction	Reference limit (U/mL)	95% confidence interval
2.5 th (lower)	0	0–0
97.5 th (upper)	29	25–44

У 93% здорових донорів значення було ≤ 20 Од/мл.

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила свій власний діапазон нормальних значень з урахуванням локальних факторів навколишнього середовища, таких, як харчування, клімат, умови життя, відбір пацієнтів і т.д.

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського CA242. Кожен зразок був довільно піпетований ($n = 2/\text{аналіз}$) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль. Аналіз проводився 42 місяці не менш ніж трьома лаборантами і з використанням 20 різних наборів CanAg CA242. Відтворюваність показана в таблиці:

Зразок	N	Середня конц. Од/мл	В аналізі SD, Од/мл	В аналізі CV, %	Між днями SD, Од/мл	Між днями CV, %
CA242 1	80	16,2	0,67	4,1	0,39	2,4
CA242 2	80	48,4	1,93	4,0	1,82	3,8
CA242 3	80	79,5	2,99	3,8	2,46	3,1
CA242 4	80	125	5,81	4,7	2,74	2,2

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору склала < 1 Од/мл і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора } 0}{\text{OD Калібратора } 15 - \text{OD Калібратора } 0} \times 15 \text{ Од/мл}$$

Відновлення

Насичені зразки сироватки були приготовлені додаванням аліквоти зразка з сильно підвищеним значенням CA242 до нормального зразка сироватки. % відновлення антигену був знайдено в діапазоні 87-107%. **ПРИМІТКА:** дослідження відновлення не повинні проводитися з використанням набору калібраторів.

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 150 000 Од/мл.

ЗАУВАЖЕННЯ: в пробах з дуже високою концентрацією копір субстрату змінюється з блакитного на зеленуватий (і навіть жовтий при дуже високих концентраціях). Це призводить до хибно низької оптичної щільності при 620 нм і в екстремальних випадках оптична щільність може падати в межах стандартної кривої, що може бути розцінено як Хук-ефект.

Лінійність розведення

Проби пацієнтів були розбавлені Розчинником зразків і проаналізовані. Отримані значення склали 97-108% від очікуваних значень.

Специфічність

	Концентрації с незначною інтерференцією (± 10 %)
Ліпемія	8 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	5 мг/мл

Порівняння методів

CapAg CA242 був порівняний з CA242 Delfia. 145 проб сироватки крові у здорових донорів крові та у пацієнтів із злоякісними і доброякісними захворюваннями, в діапазоні значень від 0-250 Од/мл були проаналізовані і була отримана лінійна регресія аналізу (4):

$$\text{CapAg CA242 EIA} = 1.02 \times \text{CA242 Delfia} - 1.1 \quad r=0.99$$

ГАРАНТІЯ

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних, припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії товарного стану та придатності для використання.

**ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Черновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com