

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОГО АНТИГЕНУ CA-125

3025-300, CA-125 Test System

Каталог. №: 3025-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 16-07-2019

Версія 4



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Призначення: Кількісне визначення концентрації ракового антигену 125 (CA-125) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

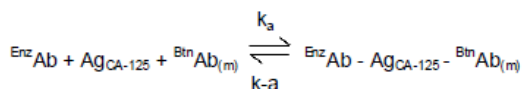
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до CA-125.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген CA-125, між CA-125 антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{BiotAb}_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{CA-125}}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

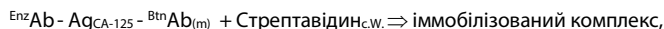
EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{CA-125}} - \text{BiotAb}_{(m)}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{с.л.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антигенів прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори CA-125 – 1 мл/флакон

6 флаконів референсної сироватки (стандартів) з концентраціями CA-125 0 (A), 15 (B), 50 (C), 100 (D), 200 (E) і 400 (F) Од/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консерванти.

Зауваження: Стандарти на основі людської сироватки приготовлені на основі афінно очищеного > 99% препарату CA-125 IRMA, були прокалібровані по тесту Centacor CA-125 IRMA.

B. Ферментний реагент CA-125 – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені афінно очищені мишачі моноклональні антитіла та біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

E. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях у низькому, середньому та підвищеному діапазонах кривої реакції на дозу для контролю ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі та значення, визначені в кожній проведеній тестовій процедурі. Діаграми контролю якості повинні вестись для того, щоб відстежувати продуктивність реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну експериментальних умов або деградацію наборів реагентів. Для встановлення причини відхилень слід використовувати свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

- Робочий Субстратний розчин** - Стабільний протягом одного (1) року
Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту анти-CA-125 у кожен лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації CA-125 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту

залежно від концентрації CA-125 в Од/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).

- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації CA-125 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.3311 перетинає стандартну криву при 29.3 Од/мл (див. мал.1)

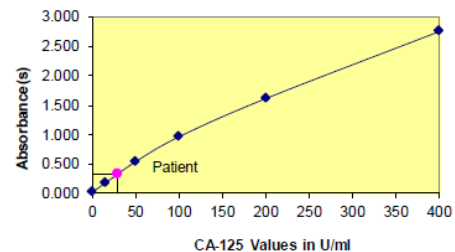
Примітка: Для розрахунку даних також може бути використане програмне забезпечення для аналізу даних, призначене для аналізу даних ELISA. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід провести перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація (Од/мл)
Калібратор А	A1	0.035	0.029	0
	B1	0.022		
Калібратор В	C1	0.186	0.182	15
	D1	0.178		
Калібратор С	E1	0.536	0.545	50
	F1	0.554		
Калібратор D	G1	0.985	0.967	100
	H1	0.949		
Калібратор E	A2	1.615	1.615	200
	B2	1.616		
Калібратор F	C2	2.749	2.753	400
	D2	2.758		
Зразок	A3	0.336	0.331	29.3
	B3	0.325		

*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «F» повинна бути ≥ 1.8 .
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки з концентраціями CA-125 понад 400 Од/мл необхідно розвести (наприклад, 1:10 або вище) нормальною чоловічою сироваткою (CA-125

< 5 Од/мл) і проаналізувати повторно. Результат помножити на фактор розведення.

- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії, і, як відомо, вони є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів", Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- CA-125 має низьку клінічну чутливість і специфічність як раковий маркер. **Само по собі значення CA-125 не є діагностичною величиною** і повинно використовуватися разом з іншими клінічними даними.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Сироваткові рівні CA 125 підвищені у 1% нормальних здорових жінок, у 3% жінок з доброякісними захворюваннями яєчників, у 6% пацієнтів з неонкологічними станами (включаючи, але не обмежуючись вагітністю в 1 триместрі, менструацією, ендометріозом, фіброзом матки, гострим сальпінгітом, захворюваннями печінки і перитонітом або перикардитом).

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тесту CA-125

Здорові та не вагітні жінки	≤ 35 Од/мл
-----------------------------	------------

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору CA-125 всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (Од/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	3.1	0.22	7.1
Рівень 2	20	28.0	1.42	5.0
Рівень 3	20	161.2	4.21	2.6

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (Од/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	3.7	0.44	11.8
Рівень 2	10	25.3	1.81	7.1
Рівень 3	10	154.0	5.11	3.4

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 1 Од/мл для даного набору.

14.3 Точність

Справжній метод порівнювався з референтним імуноферментним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з низькими, нормальними і високими показниками. Загальне число зразків було 121. Було виведено рівняння регресії за методом найменших квадратів і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референтним методом.

Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	5,67	$Y = -0,116 + 1,032(x)$	0.998
Метод порівняння	5,75		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референс-методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Для перевірки специфічності використовуваної пари антитіл до відомих сироваткових пулів додавались масивні концентрації можливих перехресних реагентів та аналізувались паралельно з базовими сироватками. Крім того, деякі широко використовувані безрецептурні препарати та деякі цитотоксичні препарати (у 10 разів більше нормальної дози) були випробувані в аналізі. Поперечної реакції не виявлено. Відсотки вилучення деяких із цих доповнень наведені нижче в Таблиці 5.

ТАБЛИЦЯ 5

Аналіт	Доданий об'єм	% Відновлення
Білірубін	1мМоль/л	98-103
Гемоглобін	1мМоль/л	100-106
Тригліцериди	10мМоль/л	96-110
РФ	1000 кМО/л	97-107
Біотин	25 мкг/л	99-103



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

