

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОГО МАРКЕРА ЯЙНИКІВ CA125

400-10, CanAg CA125 EIA

Каталог. №: 400-10

Методика від 01-2015

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 співпадати.

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg CA125 EIA призначений для кількісного визначення Ракового маркера яйників CA125 в сироватці крові людини.

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

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій техніці "сендвіч". Калібратори, контролю та сироватки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-CA125 моноклональними антитілами Ov197 (отриманими від миші) в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. У процесі інкубації CA125, що міститься в стандартах або зразках пацієнтів, адсорбується на покритих стрептавідином лунках мікропланшетів з біотинильованими анти-CA125 моноклональними антитілами. Смужки потім промиваються і інкубуються з моноклональними антитілами анти-CA125 Ov185, міченими пероксидазою хрому. Після промивання в кожну лунку додається буферний реагент субстрат/хромоген (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 CA125, присутньому у зразку.

Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що необов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину).

Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація CA125 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 °С. Не заморозуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °С) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
-----------	-----------	--

Мікропланшет	1 планшет	2-8 °С до закінчення терміну придатності
--------------	-----------	--

12x8 мікролунок, покритих стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатайте пакет, зберігайте сухим.

Калібратори CA125	1 флакон x 8 мл, 4 флакона x 0.75 мл, 0-10-40-200-500 Од/мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності
-------------------	--	--

Антиген CA125 в трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, детергент, інертний жовтий барвник і 0,05% азид натрію як консервант. Готовий до використання. Калібратор 0 використовувати також для розведення зразків.

Контролі CA125	2 флакона x 0.75 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності
----------------	---------------------	--

Антиген CA125 в трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, детергент і 0,05% азид натрію як консервант. Готовий до використання.

Біотин Анти-CA125	1 флакон x 15 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------------	------------------	--

Біотин Анти-CA125 моноклональне мишаче антитіло, ~ 2 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (рН 7.75), бичачий сироватковий альбумін, блокуючі агенти, детергенти, інертний червоний барвник і 0,05% азид натрію в якості консерванту. Готовий до використання.

Трейсер, HRP Анти-CA125	1 флакон x 0.75 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-CA125 моноклональними мишачими антитілами, ~ 30 мкг/мл. Повинен бути перед використанням змішаний з Розчинником Трейсера перед використанням. Містить консерванти.

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

Містить буферний сольовий розчин (рН 7.2), бичачий сироватковий альбумін, блокуючі агенти, детергенти, інертний синій барвник і 0.01% МІТ в якості консерванту. Готовий до використання.

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

Містить ТРИС-НСІ сольовий розчин з ТВН 20 і Germall II як коСА125рвант. 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

- Тільки для професійного використання
- Будь ласка, зверніться до публікації Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США (Bethesda, штат Меріленд, США) публікація № (CDC) 88-8395 щодо лабораторної безпеки або будь-якого іншого місцевого або національного регулювання.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Реагенти містять азид натрію в якості консерванту. Азид натрію може реагувати зі свинцем і міддю з утворенням вибухонебезпечних азидів металів. При виливанні змивайте великою кількістю води.
- Дотримуйтеся 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

CanAg CA125 EIA призначений для використання з сироваткою. Проведіть забір крові з вени і відокремте сироватку відповідно до звичайних процедур. Зразки можуть зберігатися при температурі 2-8

°C протягом 24 годин. Для більш довгих періодів зберігати при -70 °C або нижче. Зразки не повинні зберігатися в холодильній камері, яка сама розморожується. 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 700-1100 коливань/хвилину.

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 зі змінними наконечниками об'ємом 350 мкл.

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.

5. Дистильована або деіонізована вода

Для приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

- Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору CA125 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.
- 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.
- Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.
- 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 переконатися, 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 постукаючи 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. Рекоменується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переловнення* 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.
- 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).
- 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.

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.

Робочий Розчин Трейсера 3 тижні при 2-8 °C в герметичному контейнері

Приготуйте потрібний об'єм Робочого Розчину Трейсера змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-CA125 з 1 мл Розчинника Трейсера на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-CA125 (мкл)	Розчинник 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-CA125 у флакон з Розчинником Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Анти-CA125 повністю перелитий у флакон з Розчинником 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 калібратори і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °C).

- Приготуйте Промивний Розчин і Робочий Розчин Трейсера. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
- 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.
- Внесіть 25 мкл CA125 Калібраторів (CAL 0, 10, 40, 200, 500), контролей (C1 і 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. 500	Невід. 2		
B	Кал. 0	Кал. 500	І т.д.		
C	Кал. 10	C1			
D	Кал. 10	C1			
E	Кал. 40	C2			
F	Кал. 40	C2			
G	Кал. 200	Невід. 1			
H	Кал. 200	Невід. 1			

- Додайте 100 мкл Біотин Анти-CA125 в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
- Інкубуйте пластину протягом 2 годин (± 10 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
- Після першої інкубації видаліть рідину і промийте кожну смужку 3 рази, як описано в п. 4 "Зауважень по протоколу аналізу".
- Додайте в кожну лунку по 100 мкл Робочого Розчину Трейсера, в тій же послідовності, як в кроці 4.
- Інкубуйте тримач зі смужками протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним перемішуванням.
- Після другої інкубації видаліть рідину і промийте кожну смужку 6 разів, як описано в п.4 "Зауважень по протоколу аналізу".
- 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 лунки не перевищував 5 хвилин.
- 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.

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

СapAg CA125 EIA вимірює концентрації між 1.5 і 500 Од/мл. Якщо концентрація CA125 вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з Калібратором 0 перед аналізом.

Контроль якості

Контролі CA125 1 і 2 можуть бути використані для перевірки серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо значення виходять за межі зазначених діапазонів, необхідно провести повну перевірку реагентів і продуктивності зчитувача і повторити аналіз. Кожна лабораторія може додатково підготувати свої власні пули сироватки на різних рівнях, які можна використати в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

Референсний матеріал

Оскільки не існує референс-матеріалів для антигену CA125, стандарти прокалібровані проти внутрішнього референс-стандарту.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з CA125 калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів CA125 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 CA125 калібратора проти відповідної концентрації CA125 (в Од/мл). Невідомі концентрації CA125 потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Якщо зразок дає значення CA125 більше 500 Од/мл, необхідно розбавити його в співвідношенні 1/10 або 1/100 нульовим стандартом.

1: 10 розбавлення = 50 мкл зразка + 450 мкл CA125 0 Калібратора.

1: 100 розбавлення = 50 мкл розведеного 1:10 + 450 мкл CA125 0 Калібратора.

Концентрація CA125 в нерозбавлених зразках розраховується наступним чином:

Розбавлення 1/10: 10 x виміряне значення,

Розбавлення 1/100: 100 x виміряне значення.

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (Од/мл)	Середнє абс. значення (A)	CA125 Од/мл
Калібратор 0	0	0.047	
Калібратор 10	10	0.116	
Калібратор 40	40	0.298	
Калібратор 200	200	1.269	
Калібратор 500	500	2.218	
Зразок А		0.490	69.8
Зразок В		1.650	325

Малюнок (Див. оригінал інструкції).

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні CA125 не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір CA125 не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і CA125-тест не повинен замінювати інші клінічні дослідження.

Антитіла анти-реагенту (людське антитіло анти-миші (НАМА) або гетерофільні антитіла) у зразку пацієнта можуть іноді заважати аналізу, навіть якщо специфічні блокуючі агенти включені в буфері.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Середнє значення, отримане від 100 здорових жінок-пацієнтів, склало 14.7 Од/мл зі стандартним відхиленням 7.7. Медіана склала 13.1 Од/мл, в діапазоні 5.06-47.9 Од/мл. Нижня і верхня межі діапазону в нормі були досліджені при використанні рекомендованої непараметричної статистичної обробки. Контрольний інтервал містить центральну 95% фракцію контрольної області. Контрольні межі відповідно можуть бути оцінені як 2.5% (нижня) і 97.5% (верхня) фракції. Ці межі відокремлюють 2.5% фракцію значень в кожному залишку контрольної області. Непараметричні оцінки:

N = 100

Фракція	Контрольний діапазон
2.5 (нижня)	5
97.5 (верхня)	39

96% проаналізованих здорових жінок продемонстрували значення нижче 35 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 CA125. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 10 днів поспіль. Аналізи проводились на протязі 8 місяців, двома і більше лабораторіями, з використанням 10 різних наборів CapAg CA125. 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, %
CA125 1	40	16.8	0.74	4.4	0.53	3.1
CA125 2	40	75.7	3.26	4.3	2.42	3.2
CA125 3	40	201	8.55	4.3	7.58	3.8
CA125 4	40	392	11.4	2.9	15.5	4.0

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору склала < 1.5 Од/мл і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора } 0}{\text{OD Калібратора } 10 - \text{OD Калібратора } 0} \times 10 \text{ Од/мл}$$

Відновлення

Зразки сироватки були приготовлені додаванням антигену CA125 до нормальних зразкам сироватки. % відновлення антигену був виявлений в діапазоні 100 ± 15%.

Ефект Високої дози

Ефект високої дози не спостерігається для зразків з концентраціями до 50 000 Од/мл.

ЗАУВАЖЕННЯ: в пробах з дуже високою концентрацією копій субстрату змінюється з блакитного на зеленуватий (і навіть жовтий при дуже високих концентраціях). Це призводить до хибно низькою оптичної щільності при 620 нм і в екстремальних випадках оптична щільність може падати.

Лінійність розведення

Проби пацієнтів були розбавлені розріджувачів зразків і проаналізовані. Отримані значення були отримані від очікуваних значень в діапазоні 100 ± 15%.

Специфічність

	Концентрації с незначною інтерференцією (± 10 %)
Ліпемія	4 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	5 мг/мл

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