

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НЕЙРОН-СПЕЦИФІЧНОЇ ЕНОЛАЗИ (NSE)

420-10, CanAg NSE EIA

Каталог. №: 420-10

Методика від 07-2013

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 співпасти.

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg NSE EIA призначений для кількісного визначення Нейрон-специфічної Енолази NSE в сироватці крові людини.

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

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на використанні двох типів моноклональних мишачих антитіл, спрямованих проти двох різних антигенних детермінант в молекулі НСЕ. Використовувані моноклональні антитіла зв'язуються з γ -субодиницею ферменту і отже, детектують і $\gamma\gamma$ і $\alpha\gamma$ форми. Стандарти та сироватки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-НСЕ антитілами МАb E21 і моноклональними антитілами E17, кон'югованими з пероксидазою хрому (HRP) в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. 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 NSE, присутньому у зразку.

Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що не обов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандарти криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація NSE 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 заморожуйте.
- 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 NSE А-Е	5 флаконів х 0.75 мл, ліофілізовані	4 тижні при 2-8 °С 3 місяці при -20 °С
---------------------	-------------------------------------	---

Ліофілізовані калібратори містять людський NSE у білковому матриці, 0.01% метил-ізоціазолін (MIT) як консервант. Перед використанням мають бути розведені 0.75 мл води. **ЗАУВАЖЕННЯ:** точні концентрації NSE специфічні для кожного лота і проставлені на етикетках кожного флакона.

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

Біотин Анти-NSE моноклональне мишаче антитіло, ~ 2 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (рН 7.1), бичачий сироватковий альбумін, блокуючі агенти, детергент, інертний синій барвник і 0.01% метил-ізоціазолін (MIT) в якості консерванту. Повинен бути змішаний перед використанням з трейсером, HRP/анти-NSE.

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

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-NSE моноклональними мишачими антитілами, ~ 40 мкг/мл. Повинен бути перед використанням змішаний з Біотином анти-NSE. Містить 0.02% MIT, 0.02% бромнітродіоксана і 20 ppm Proclin™ 300.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон х 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 х 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 х 50 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить ТРИС-НСІ 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

- 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.
- 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

Набір розроблений для використання сироватки. Зберіть кров венепункциєю і відокремте сироватку стандартною процедурою. Сироватка повинна бути відокремлена протягом 60 хвилин після збору зразків, щоб уникнути виходу NSE з клітин крові. Не використовуйте гемолізовані зразки. Використання плазми не рекомендується, так як значна кількість NSE може вивільнятися з тромбоцитів. Зразки можуть зберігатися 24 години при 2-8 °С. Для більш тривалого зберігання їх потрібно заморожувати при -70 °С або нижче. Зразки не можна зберігати в холодильниках з саморозморозкою. Заморожуйте тільки один раз. Зразки не можна розморозувати й знову заморожувати перед аналізом. Дозвольте замороженим зразкам повільно розморозитися при 2-8 °С протягом ночі і потім приведіть 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/хвилину.
2. **Пристрій для промивання мікропланшета**
Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1 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 розведення Калібраторів і приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

- Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору NSE 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'якко, 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 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 постукати 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.
- 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
------------------------	--------------------------------------

Калібратори NSE	4 тижні при 2-8 °C 3 місяці при -20 °C
-----------------	---

Додайте точно 0.75 мл дистильованої води в кожен флакон і добре перемішайте. Залиште на 15 хвилин при кімнатній температурі для повного розчинення.

ЗАУВАЖЕННЯ: точні концентрації калібраторів вказані на флаконах і повинні використовуватися для розрахунків.

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.

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

Приготуйте потрібний обсяг Розчину Антитіл змішуванням 50 мкл Трейсер, HRP Анти-NSE з 1 мл Біотину Анти-NSE на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-NSE (мкл)	Біотин Анти-NSE (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 Розчину Антитіл.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсер, HRP Anti-NSE у флакон з Біотином Анти-NSE і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Anti-NSE повністю перелитий у флакон з Біотином Анти-NSE.

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролі 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 Калібратори, Промивний Розчин і Розчин Антитіл. 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 NSE Калібраторів (CAL A, B, C, D, E) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. A	Кал. E	Невід. 4		
B	Кал. A	Кал. E	І т.д.		
C	Кал. B	Невід. 1			
D	Кал. B	Невід. 1			
E	Кал. C	Невід. 2			
F	Кал. C	Невід. 2			
G	Кал. D	Невід. 3			
H	Кал. D	Невід. 3			

- Додайте 100 мкл Розчину Антитіл 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 1 години (± 10 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
- Після інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів.
- 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.
- Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
- Негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

Альтернативний варіант

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

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

Діапазон вимірювання

NSE EIA вимірює концентрації між 1 і 150 мкг/л. Якщо концентрація NSE 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 NSE (див. "Розрахунок результатів").

Контроль якості

CapChek контрольні сироватки пухлинного маркера 1 і 2 рівнів (отримуються додатково, REF 107-20) рекомендуються для перевірки серії аналізу. Якщо значення поза зазначеним діапазоном, повна перевірка реагентів і продуктивності зчитувача повинні бути проведені і аналіз повторюється.

Референсний матеріал

Оскільки не існує міжнародного референсного стандарту для антигену NSE, значення калібраторів даного набору NSE 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 NSE калібраторів.

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

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

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

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

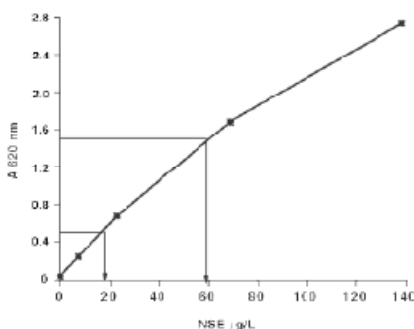
Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні NSE вище, ніж 150 мг/л, зразки необхідно розвести 1/10 з нормальною людською сироваткою і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію NSE. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути проаналізований з метою визначення ендогенної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

Концентрація NSE з нерозведеному зразку обчислюється таким чином:

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

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (мг/л)	Середнє абс. значення (A)	NSE мг/л
Калібратор А	0	0.037	
Калібратор В	7.5	0.238	
Калібратор С	22.9	0.663	
Калібратор D	68.4	1.688	
Калібратор E	138.0	2.720	
Зразок А		0.518	17.5
Зразок В		1.474	57.8



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

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

Підвищені значення NSE, зумовлені не пухлинами, можуть зустрічатися у діалізних пацієнтів і пацієнтів з лейкеміями. Сироватка не повинна мати видимого гемолізу (оптична щільність не мутного зразка при довжині хвилі 500 нм не повинна перевищувати 0.3), так як еритроцити містять значні кількості NSE (7). Тривале зберігання цільної крові може викликати вивільнення NSE з клітин крові.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

NSE вимірювалися у 495 здорових донорів крові. 97.5% мали концентрації 10.5 мкг/л або нижчі, і 95% мали концентрації 9.9 мкг/л або нижчі. Середнє значення складає 6.5 мкг/л.

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського NSE. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль. Аналіз проводився 40 місяців не менш ніж трьома лаборантами і з використанням 20 різних наборів CapAg NSE Відтворюваність показана в таблиці:

Зразок	N	Середня конц. мкг/л	В аналізі SD, мкг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, мкг/л	Між днями CV, %
NSE 1	80	10.3	0.24	2.3	0.57	5.5
NSE 2	80	23.7	0.82	3.5	0.97	4.1
NSE 3	80	48.2	1.02	2.1	1.93	4.0
NSE 4	80	92.7	1.60	1.7	3.44	3.7

Межа виявлення (чутливість)

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

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора А}}{\text{OD Калібратора В} - \text{OD Калібратора А}} \times [\text{CAL В}] \text{ мкг/л}$$

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 200 000 мкг/л.

Лінійність розведення

Проби пацієнтів були розбавлені нормальною сироваткою і проаналізовані. Отримані значення склали 93-101% від очікуваних значень.

Специфічність

Специфічність	Концентрації с незначною інтерференцією (± 10 %)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 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 «ДІАМЕВ»
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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕВ»