

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
У СИРОВАТЦІ ЛЮДИНИ
РАКОВОГО АНТИГЕНУ ЯЄЧНИКА СА-12-5

6502-16, СА-12-5

Каталог. №: 6502-16

Методика від 14-09-2015

Кількість : 96

Виробник : DAI (США)



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

Аналіз	СА-12-5 ELISA
Метод	Імуносорбентний аналіз із застосуванням фіксованих ферментів
Принцип	Сендвіч комплекс
Діапазон визначення	0-400 Од/мл
Зразок	50 мкл сироватки
Специфічність	97 %
Чутливість	5 Од/мл
Загальний час	~ 200 хвилин
Строк придатності	12 місяців від дати виробництва

ПРИЗНАЧЕННЯ

Даний набір призначений для моніторингу та перевірки. Патологічні результати (наприклад, підвищений рівень СА-12-5 у сироватці) можуть вказувати на рак яєчників і вимагає подальшого клінічного втручання. Аналіз сироватки на СА-12-5 є пухлинним маркером для пацієнтів при клінічній ремісії, наступною за лікуванням. Післяопераційні значення СА-12-5 у сироватці поза нормою вказують на наявність залишків пухлини. Пухлинний рецидив часто супроводжується збільшенням СА-12-5 в сироватці до того, як прогресуюча хвороба стане клінічно очевидною.

ВСТУП

Одна з 70 американських жінок хворіє на рак яєчників. Приблизно 20000 нових діагнозів раку яєчників ставиться щороку і більш ніж 12000 жінок помирає. Рак яєчників є найбільш поширеним типом гінекологічних пухлин, з коефіцієнтом виживання 30 %. Це обумовлено тим, що часто діагноз ставиться вже на прогресуючій стадії. Раковий антиген СА-12-5 - це поверхневий антиген, асоційований з епітеліальним раком яєчників. У сироватці СА-12-5 асоціюється з глікопротеїном з високою молекулярною вагою. Концентрація цього ракового маркера в сироватці може визначитися і вимірюватися муриновим моноклональним антитілом. Дослідження показали, що підвищений рівень СА-12-5 виявлений також в індивідів при аденокарциномі фаллопієвих труб, при злоякісних не гінекологічних пухлинах і деяких умовах, що не пов'язані із злоякісними пухлинами.

Концентрація СА-12-5 в сироватці вище, ніж 35 Од/мл у близько 60% жінок з раком яєчників. У більш ніж 80% пацієнтів з поширеним раком яєчників концентрація СА-12-5 вище, ніж 35 Од/мл. Рівень СА-12-5 підвищений в 1% нормальних здорових жінок, у 3% нормальних здорових жінок з легкими захворюваннями яєчників, у 6% при умовах, що не пов'язані з пухлиною (включаючи перший триместр вагітності, менструація, ендоміоз, фіброз матки, Стрий сальпінгіт, захворювання печінки і запалення очеревини, перикард і плеври). Рівень СА-12-5 в сироватці вище, ніж 35 Од/мл разом з тазовою оцінкою збільшує специфічність тесту. Послідовне визначення СА-12-5 в сироватці потім підсилює позитивні показники тесту при пухлині яєчників. Концентрація СА-12-5 може використовуватися при моніторингу пацієнтів з раком яєчників. Високе значення СА-12-5 може асоціюватися з прогресуючою злоякісною хворобою і поганою відповіддю на терапію. З іншого боку, зменшення СА-12-5 дає хороші прогнози і вказує на відповідну відповідь на лікування. Залишкова хвороба підтверджена в 95% випадків при концентрації СА-12-5 в сироватці вище, ніж 35 Од/мл, проте негативний результат не виключає наявність хвороби. До відома, СА-12-5 є найбільш чутливим маркером залишкової епітеліальної пухлини яєчників. СА-12-5 також може збільшуватися у пацієнтів з пухлиною легенів, цервікальною пухлиною, пухлиною матки і маткових труб, а також фаллопієвих труб.

ПРИНЦИП ДОСЛІДЖЕННЯ

Набір кількісного аналізу СА-12-5 ґрунтується на твердофазовому імуноферментному аналізі. У ньому використовується одне моноклональне анти-СА-12-5 антитіло для іммобілізації твердої фази (мікропланшетні лунки) і інше моноклональне анти-СА-12-5 антитіло в розчині кон'югату антитіла-ферменту (пероксидази хрому). Стандарти та зразки тесту додаються в мікропланшетні титрувальні лунки, покриті антитілом СА-12-5. Потім додається антитіло СА-12-5, мічене пероксидазою хрому (кон'югатом). Якщо СА-12-5 присутній у зразку, воно зв'язується з антитілом в лунці і ферментним кон'югатом, в результаті чого молекули СА-12-5 розшаровуються між твердою фазою і ферментно-пов'язаними антитілами. Після 3 годинної інкубації при 37 °С лунки промиваються водою для видалення незв'язаних мічених антитіл. Додається розчин ТМБ і інкубується 20 хвилин, в результаті чого розвивається блакитний колір. Розвиток кольору зупиняється додаванням 2N HCl. Колір змінюється на жовтий і вимірюється спектрофотометрично при 450 нм. Концентрація СА-12-5 прямо пропорційна інтенсивності кольору в аналізованому зразку.

ЗАБІР І ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

1. Кров повинна бути зібрана з застосуванням стандартної медичної методики венопункції і сироватка повинна бути відокремлена від червоних тілець крові якомога швидше. Уникайте сильно гемолізованих, ліпемічних і каламутних зразків.
2. Зразки плазми, зібрані в пробірки, що містять EDTA, гепарин або оксалат, можуть впливати на процедуру аналізу і їх необхідно уникати.
3. Зразки необхідно закрити і зберігати 48 годин при 2-8 °С до початку аналізу. Зразки для більш тривалого терміну зберігання необхідно заморозити до -20 °С. Розморожені зразки слід перемішати перед аналізом.

МАТЕРІАЛИ І КОМПОНЕНТИ

Надані матеріали в наборі для дослідження:

1. **Мікротитрувальний планшет** на 96 лунок, покритий мишачими моноклональними антитілами СА-12-5.
2. **Реагент ферментного кон'югату**, 12 мл.
3. **Референтні стандарти СА-12-5**, що містять 0, 15, 50, 100, 200 і 400 Од/мл СА-12-5, рідкі, готові до використання.
4. **Субстрат ТМБ**, 12 мл.
5. **Стоп розчин**, 12 мл.
6. **Концентрат промивного буфера (50x)**, 15 мл.

Необхідні матеріали, які не постачаються:

- Точні піпетки і наконечники: 0,04 - 0,2 мл.
- Одноразові наконечники.
- Дистильована вода.
- Вихровий змішувач.
- Промокальний папір або паперовий рушник.
- Мікротитрувальний планшет-рідер.
- Міліметровий папір.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Перед використанням всі реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (18-25 °С) і перемішані легким перевертанням або погойдуванням. УНИКАЙТЕ УТВОРЕННЯ ПІНИ.
2. Розбавте 1 частину промивного буфера (50x) 49 частинами дистильованої води. Наприклад, розбавте 15 мл концентрату розчину для промивання буфера (50x) дистильованою водою, щоб приготувати 750 мл промивного буфера (1x). Перед використанням добре перемішати.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Закріпіть в тримачі потрібну кількість лунок з покриттям. Внесіть у відповідні лунки по **50 мкл** стандартів, зразків і контролів. Ретельно, але обережно перемішайте протягом 10 сек.
2. Внесіть в кожную лунку по **100 мкл** реагенту ферментного кон'югату. Ретельно перемішайте протягом 30 сек. Дуже важливо домогтися повного змішування на цьому етапі. Інкубуйте при 37 °С 3 години.
3. Видаліть вміст лунок. Промийте і видаліть вміст планшета 5 разів промивальним буфером (1x). Різно витрусіть планшет на промокальний папір, щоб видалити всі залишки крапель води.
4. Внесіть в кожную лунку по **100 мкл** реагенту субстрату ТМБ. Легко змішуйте 10 сек. Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі в темряві.
5. Зупиніть реакцію додаванням **100 мкл** стоп-реагенту в кожную лунку. Легко змішуйте 10 сек. Дуже важливо, щоб блакитний колір повністю став жовтим.
6. Виміряйте оптичну щільність лунок при 450 нм на протязі **15 хвилин**.

Важливе зауваження:

- Процедура промивання має велике значення. При недостатньо ретельному промиванні результати будуть неточними, і рівень оптичної щільності лунок буде завищений.
- У разі ручного піпетування не рекомендується в одному аналізі використовувати більше 32 лунок, так як внесення всіх калібрувальних, контрольних та досліджуваних зразків не повинно займати більше 5 хвилин. У разі автоматичного піпетування можна використовувати весь планшет з 96 лунок.
- Хоча дублювання всіх стандартів і зразків не потрібно, але рекомендується.

ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

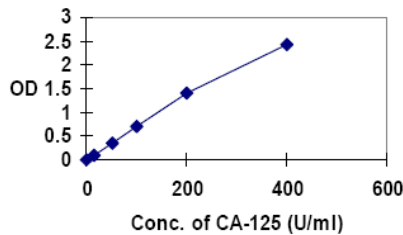
Визначте середню абсорбцію для кожного набору стандартів, контролей і зразків. На міліметровому папері побудуйте калібрувальну криву, відкладаючи середню абсорбцію, отриману від кожного референтного стандарту, проти його концентрації в Од/мл зі значеннями абсорбції на вертикальній або вісі Y і концентраціями на горизонтальній або вісі X. Використовуйте середні значення поглинання для кожного зразка, щоб визначити з калібрувальної кривої відповідну концентрацію СА-12-5 в Од/мл. Будь-які розбавлені зразки повинні бути уточнені відповідним коефіцієнтом розведення.

ПРИКЛАД ТИПОВОЇ КАЛІБРУВАЛЬНОЇ КРИВОЇ

Результати типового вимірювання поглинання стандартів зі зчитуванням оптичної щільності при 450 нм вказані на вісі Y проти концентрацій СА-12-5 на вісі X.

СА-12-5 (нг/мл)	Абсорбція (450 нм)
0	0,010
15	0,105
50	0,347
100	0,703
200	1,411
400	2,437

Справжня калібрувальна крива наведена лише як приклад і не повинна використовуватися для обчислення невідомих значень. Кожен користувач повинен отримати свою власну калібрувальну криву і дані.



ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ І ЧУТЛИВІСТЬ

Здорові жінки повинні мати значення СА-12-5 нижче 35 Од/мл. Мінімальна концентрація СА-12-5, яка визначається за допомогою даного набору, склала 5 Од/мл.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Достовірність:** порівняння між нашим тестом і комерційно доступним тестом надає наступні дані: N = 62
Коефіцієнт кореляції = 0.981
Нахил = 0.933
Перетин = 2.06
Середнє (наші набори) = 38.79
Середнє (Abbott) = 35.88

II. Точність:

1) В серії:

Концентрації	N	Середнє	SD	CV, %
Рівень 1	20	16.27	0.970	5.96
Рівень 2	20	86.26	4.290	4.97

2) Між серіями:

Концентрації	N	Середнє	SD	CV, %
Рівень 1	10	17.19	1.698	9.87
Рівень 2	10	88.62	6.160	6.95

III. Лінійність:

Дві сироватки пацієнта серійно розводили Стандартом 0 Од/мл в лінійному дослідженні. Середнє відновлення склало 99.0%.

Зразок А			
Розведення	Очікуване значення	Отримане значення	Відновлення, %
Нерозведений	218.02	218.02	101.5
2X	109.01	110.62	97.3
4X	54.51	53.02	95.8
8X	27.25	26.11	108.6
16X	13.63	14.80	
Середнє відновлення: 100.8 %			

Зразок В			
Розведення	Очікуване значення	Отримане значення	Відновлення, %
Нерозведений	260.33	260.33	
2X	130.17	128.23	98.5
4X	65.08	64.98	99.8
8X	32.54	31.76	97.6
16X	16.27	15.11	92.9
Середнє відновлення: 97.2 %			

IV. Чутливість

Чутливість визначали як концентрацію СА-12-5, яка відповідає поглинанню, яке на два стандартних відхилення більше, ніж середнє поглинання 20 повторів нульового калібратора. Мінімальна визначувана концентрація цього аналізу складає 5.0 Од/мл.

V. Перехресна реактивність

Наступні антигени маркерів раку у високих концентраціях були проаналізовані, щоб визначити можливі реактивності.

Antigens	Concentration	Equivalent CA-125	% Cross-reactivity
CA 15-3	1,000 U/mL	0.00	0.00
CA 19-9	1,000 U/mL	0.00	0.00
PSA	1,000 ng/mL	0.00	0.00
PAP	1,000 ng/mL	0.00	0.00
AFP	10,000 ng/mL	0.00	0.00
CEA	1,000 ng/mL	0.00	0.00

VI. Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігався при концентраціях 5.000 Од/мл.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Достовірні результати будуть досягнуті тільки при повному розумінні інструкції до набору.
- Процедура промивання дуже важлива. Недостатнє промивання призведе до низької точності і помилково підвищеним зчитуванням абсорбції.
- Зразки пацієнтів можуть містити людські анти-мишачі антитіла (НАМА), що можуть впливати на результати. Даний набір розроблений для мінімізації такого роду впливу. Але повного виключення цього впливу неможливо гарантувати. Результати аналізу, які не відповідають клінічній картині або історії хвороби пацієнта, повинні інтерпретуватися з обережністю.

ЗБЕРІГАННЯ НАБОРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ І ІНСТРУМЕНТАРІЮ

- Нерозкриті набори повинні зберігатися після отримання при 2-8 °С. Для мінімізації впливу вологого повітря мікротитрувальний планшет повинен зберігатися при 2-8 °С в запечатаному вигляді разом з осушувачем. Тестовий набір може використовуватися до закінчення терміну придатності (один рік після дати виготовлення). Дивіться дату придатності, зазначену на етикетці.
- Відкритий набір залишається стабільним до закінчення терміну придатності, за умови, що вони зберігаються з дотриманням вищевказаних умов.
- Мікротитрувальний планшет-рідер з шириною доріжки 10 нм або менше і діапазоном оптичної щільності 0-2 або більше при 450 нм, є прийнятним для використання у вимірі абсорбції.



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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»