

**НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
БІЛКА S-100 ЗАГАЛЬНОГО**

708-10, CanAg S100 EIA

Каталог. №: 708-10

Методика від 05-2010

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 S100 EIA призначений для кількісного визначення S100B (S100A1B + S100BB) у сироватці крові.

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

ПРИНЦИП МЕТОДУ

CanAg S100 EIA є імуноаналізом твердої фази, двокроковим, не конкурентним на основі двох мишачих моноклональних антитіл, специфічних до двох різних епітопів, виражених в S100B. Аналіз визначає як S100A1B, так і S100BB без перехресної реактивності з іншими формами S100. Калібратори та зразки пацієнтів інкубують разом з біотинильованим Анти-S100B моноклональним антитілом (Mab) S23 в мікролунках, з нанесеним стрептавідином. S100B, присутній в калібраторах або зразках, адсорбується в лунках, покритих стрептавідином, біотинильованим Анти-S100B MAb під час інкубації. Смужки потім промивають і інкубують з пероксидазою хрому (HRP), міченими анти-S100B MAb S53. Після промивання в кожну лунку додається буферний субстрат/хромоген 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 S100B, 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 S100B 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 запечатуйте пакет, зберігайте сухим.		
Калібратори S100 A-F	6 флаконів x 1 мл, ліофілізовані	4 тижні при 2-8 °С 3 місяці при -30 °С і нижче
Ліофілізовані калібратори містять бичачий S100B в білковій матриці з 0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ в якості консерванта. Розвести водою перед використанням. ПРИМІТКА: Точні концентрації S100B є специфічними для кожного лота і вказуються на етикетці		

кожного флакона.

Біотин Анти-S100	1 флакон x 15 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Біотин Анти-S100 моноклональне мишаче антитіло, ~ 2 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (pH 7.2) з CaCl₂, бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, Tween 20, інертний синій барвник і 0.01% MIT в якості консерванту. Готовий до використання.

Трейсер, HRP-мічений анти-S100	1 флакон x 0.75 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-S100 моноклональними мишачими антитілами, ~ 20 мкг/мл. Містить консерванти. Перед використанням повинен бути розведений Розчинником Трейсера.

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

Забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH 7.2) з бичачим сироватковим альбуміном, блокуючими агентами, миючим засобом, інертним синім барвником і 0.01% MIT 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 TPIC-HCl сольовий розчин з TBH 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.
- Реагенти містять азид натрію (NaN₃) в якості консерванту. Азид натрію може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні зміти з великою кількістю води, щоб запобігти азидного нарощування.
- Дотримуйтеся місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

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 °С протягом 24 годин. Для тривалого часу зберігайте зразки при -20 °С або нижче. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі 2-8 °С 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. Поздовжнє струшування близько 200 коливань/хв., коливання 700-900/хв..

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 Nunc Immuno-8 вошер 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 мілілітрах.

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 S100 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 ефективною і ретельною 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 постукаєти нею по фільтрувальному паперу.
 - Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкції 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 S100	4 тижні при 2-8 °C 3 місяці при -30 °C і нижче

Додати рівно 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води в кожну пробірку і обережно перемішати. Дати постояти не менше 15 хвилин для відновлення.
ПРИМІТКА: Концентрації Контролів вказані на етикетках і повинні бути використані для розрахунку результатів.

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

Приготуйте потрібний об'єм Робочого Розчину Трейсера змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-S100 з 1 мл Розчинника Трейсера на смужку (див. таблицю нижче).

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-S100 (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 Розчину Антитіл.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-S100 у флакон з Розчинником для Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Анти-S100 повністю перелитий у флакон з Розчинником Трейсера.

ПРИМІТКА: Робочий Розчин Трейсера стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °C. Не готуйте більше 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. Калібрвальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °C).

- Приготуйте Калібратори, 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 збирається використовувати протягом 30 хвилин.
- Внесіть 50 мкл S100 Калібраторів (CAL A, B, C, D, E, F) 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	І т.д.		
B	Кал. A	Кал. E			
C	Кал. B	Кал. F			
D	Кал. B	Кал. F			
E	Кал. C	Невід. 1			
F	Кал. C	Невід. 1			
G	Кал. D	Невід. 2			
H	Кал. D	Невід. 2			

- Додайте 100 мкл Біотини Анти-S100 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, використовуючи процедуру промивання, описану в п.4.
- Додайте 100 мкл Робочого розчину Трейсера в кожну лунку. Використовуйте ту ж техніку піпетування як і в пункті 4 вище.
- Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
- Після другої інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів, використовуючи процедуру промивання, описану в пункті 4.
- Додайте 100 мкл субстрату TMB в кожну лунку, в той 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:

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

Діапазон вимірювання

S100 EIA вимірює концентрації між 10 і 3500 нг/л. Якщо концентрація S100 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 S100 (див. "Розрахунок результатів").

Контроль якості

CanChek контрольні сироватки пухлинного маркера 1 і 2 рівнів (отримується 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 немає єдиного довідкового матеріалу, доступного для S100A1B або S100BB, значення CanAg S100 калібратора визначаються з набором внутрішніх еталонів.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з S100 калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів S100 рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 нг/л.
- 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 нг/л.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 нг/л.

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

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (A), отриманих для кожного S100 калібратора проти відповідної концентрації S100 (в нг/л). Невідомі концентрації S100 потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

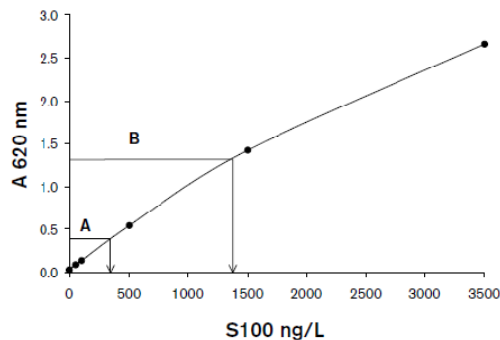
Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні S100 вище, ніж Калібратор F (3500 нг/л), зразки необхідно розвести 1/10 з нормальною людською сироваткою і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію S100. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути проаналізований з метою визначення ендогенної концентрації S100.

Концентрація S100 з нерозведеному зразку обчислюється таким чином:

Розведення 1/10: $10x [S100]_{\text{розвед. зразок}} - (0.9x [S100]_{\text{нормальна сироватка}})$

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (нг/л)	Середнє абс. значення (A)	S100 нг/л
Калібратор A	0	0.041	
Калібратор B	50	0.091	
Калібратор C	100	0.139	
Калібратор D	500	0.540	
Калібратор E	1500	1.425	
Калібратор F	3500	2.663	
Зразок A		0.352	305
Зразок B		1.377	1435



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні S100 не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір S100 не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і S100-тест не повинен замінювати інші клінічні дослідження.

Підвищення рівня сироваткового S100B слід інтерпретувати з обережністю для пацієнтів, схильних до травм, таких як переломи кісток, опіки, внутрішні пошкодження м'яких тканин та хірургії, так як ці умови пов'язані зі значним вивільненням S100B (14).

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

S100B вимірювалися у 269 здорових донорів крові. Нижнє і верхнє значення нормального діапазону були вивчені за допомогою дослідження непараметричної статистичної обробки, рекомендованого IFCC. Референсний інтервал містить центральну 95% частку від еталонного розподілу. Верхня межа завдання була відповідно оцінена як 97,5% верхньої фракції.

	Mean (ng/L)	SD (ng/L)	Upper reference limit
Healthy blood donors n=269	54	15.6	90 ng/L

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 концентрації пулованої замороженої сироватки з додаванням людського S100 і 22 різних комбінацій реагентів CanAg S100 EIA. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль.

Зразок	N	Середня конц. нг/л	В аналізі SD, нг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, нг/л	Між днями CV, %
S100 1	80	70	2	2.5	2	2.2
S100 2	80	302	5	1.6	8	2.5
S100 3	80	1440	20	1.4	21	1.5
S100 4	80	2260	30	1.3	85	2.0

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору складала ≤ 10 нг/л і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора A}}{\text{OD Калібратора B} - \text{OD Калібратора A}} \times [\text{CAL B}] \text{ нг/л}$$

Відновлення

Насичені зразки сироватки були приготовлені додаванням людського S100 до нормального зразка сироватки. % відновлення антигену був знайдено в діапазоні 97-105%. **ПРИМІТКА:** дослідження відновлення не повинні проводитися з використанням набору калібраторів.

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 150 000 нг/л. **ПРИМІТКА:** У зразках з дуже високими значеннями колір субстрату буде змінюватися від синього до зеленуватого (і, зрештою,

до жовтого). Це призведе до хибно низької оптичної щільності при 620 нм, а в крайніх випадках оптична щільність може перебувати в межах калібрувальної кривої і відмічена як хук-ефект.

Лінійність розведення

Проби пацієнтів були розбавлені з нормальною сироваткою людини і проаналізовані. Отримані значення склали $\pm 10\%$ від очікуваних значень.

Специфічність

	Концентрації с незначною інтерференцією ($\pm 10\%$)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	3.9 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