

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
АНТИГЕНУ ПЛОСКОКЛІТИННОЇ
КАРЦИНОМИ (SCC)

800-10, CanAg SCC EIA

Каталог. №: 800-10

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.

УВАГА! SCC-антиген присутній в шкірі, на волоссі, в слині, поті та інших виділеннях (наприклад, в краплях при чханні). Для запобігання контамінації і отримання хибнопозитивних результатів необхідно обов'язково використовувати рукавички з моменту розкриття упаковки і протягом всієї процедури, при роботі з мікропланшетом, смужками, дозаторами, наконечниками, пробірками і т.д. Крім того, всі отримані підвищені значення повинні бути підтверджені повторним тестуванням.

ПРИЗНАЧЕННЯ

Справжній набір призначений для кількісного визначення SCC-антигену (антигену плоскоклітинної карциноми) в сироватці або плазмі.

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

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій технології "сендвіч". Калібратори, Контролі та зразки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-SCC моноклональними антитілами в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. Після промивання в кожну лунку додається буферний субстрат/хромогенний 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 SCC, 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 SCC 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 °C. 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 °C) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °C 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 SCC	5 флаконів x 0.75 мл, ліофілізовані	4 тижні при 2-8 °C 3 місяці при -20 °C

Ліофілізовані калібратори містять людські SCC в буферному соловому розчині Tris-HCl, що містить бичачий сироватковий альбумін, наповнювач, інертний жовтий барвник і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Має бути відновлений з водою перед використанням. **ПРИМІТКА:** Точні концентрації SCC є специфічними для кожного лоту і вказуються на етикетці кожного флакона.

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

Біотин Анти-SCC моноклональне мишаче антитіло, ~ 1 мкг/мл. Містить буферний соловий розчин (pH 7.2), бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, детергент, інертний синій барвник і 0.01% MIT в якості консерванту. Має бути змішаний з Tracer, HRP Anti-SCC перед використанням.

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

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-SCC моноклональними мишачими антитілами, ~ 40 мкг/мл. Містить консерванти. Перед використанням повинен бути змішаний з Біотин Анти-SCC.

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

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивного буфера	1 флакон x 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------------------	------------------	--

Містить TPIC-HCl соловий 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.

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 °C протягом 1 дня. Для тривалого часу зберігайте зразки при -70 °C або нижче. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. 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

- Мікропланшетний шейкер**
Струшування має бути середнім або енергійним, приблизно 700-1100 коливань/хв.
- 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-миканальну піпетку з одноразовими наконечниками на 350 мкл.
- 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 мікролітах та мілілітрах.

5. Дистильована або деіонізована вода

Для відтворення Калібраторів SCC та для приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

- Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору SCC 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 20-25 °C для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'яко, але ретельно перемішані обержним 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 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. Рекомендується 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 ТМВ-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності ТМВ 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 ТМВ-субстрату HRP.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Калібратори SCC	4 тижні при 2-8 °C 3 місяці при -20 °C і нижче
Додати рівно 0.75 мл дистильованої води в кожну пробірку і обережно перемішати. Дати постояти не менше 15 хвилин для відновлення. ПРИМІТКА: Концентрації калібраторів 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.	
Розчин Антитіл	3 тижні при 2-8 °C

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

Кількість смужок	Трејсер, HRP Anti-SCC (мкл)	Біотин Анти-SCC (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-SCC у флакон з Розчинником для Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трејсер, HRP Анти-SCC повністю перелитий у флакон з Біотином Анти-SCC.

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролю 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 SCC, 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 SCC 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			
B	Кал. A	Кал. E			
C	Кал. B	Невід. 1			
D	Кал. B	Невід. 1			
E	Кал. C	Невід. 2			
F	Кал. C	Невід. 2			
G	Кал. D	І т.д.			
H	Кал. D				

- 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 (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
- Промийте кожну смужку 6 разів, використовуючи процедуру промивання, описану в пункті 4.
- Додайте 100 мкл субстрату ТМБ 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:

Альт. 9. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

Діапазон вимірювання

SCC EIA вимірює концентрації між 0.3 і 50 мкг/л. Якщо концентрація SCC 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 SCC (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 SCC антигену, значення CanAg SCC 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 SCC калібраторів.

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

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

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

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

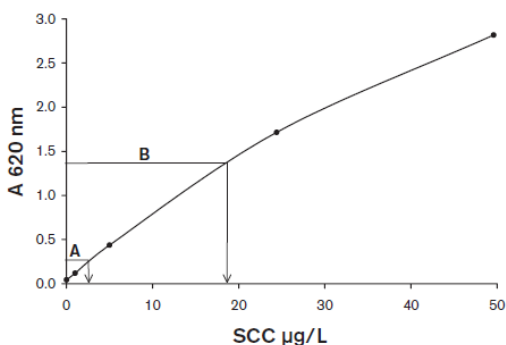
Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні SCC вище, ніж 50 мкг/л, зразки необхідно розвести 1/10 з нормальною людською сироваткою і повторити аналіз, щоб отримати точну концентрацію SCC. **ПРИМІТКА:** Зразок, використовуваний для розведення, також повинен бути проаналізований з метою визначення ендогенної концентрації SCC.

Концентрація SCC з нерозведеному зразку обчислюється таким чином:

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

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (мкг/л)	Середнє абс. значення (A)	SCC мкг/л
Калібратор А	0	0.043	
Калібратор В	1	0.119	
Калібратор С	5	0.437	
Калібратор D	24	1.715	
Калібратор E	50	2.818	
Зразок А		0.245	2.6
Зразок В		1.363	18.3



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

SCC антиген присутній в епітелії нормальних плоских клітин і підвищений SCC антиген може бути знайдений при шкірних захворюваннях, пов'язаних з гіперкератозом, наприклад, псоріазом і екземою. Підвищені рівні також спостерігаються при доброякісних захворюваннях, таких як запальні захворювання легенів і печінки або ниркової недостатності (4, 9).

Рівень SCC, отже, не може бути використаний як абсолютний доказ наявності або відсутності злоякісного захворювання, а тест SCC не слід використовувати для скринінгу раку. Результати тесту повинні бути інтерпретовані тільки в поєднанні з іншими дослідженнями і процедурами в діагностиці захворювань та лікуванні пацієнтів, і SCC тест не повинен замінювати будь-яке встановлене клінічне обстеження.

SCC антиген присутній в шкірі, поті і слині, і легко розподіляється у вигляді аерозолів (наприклад, в результаті чхання). Для того, щоб уникнути помилкових підвищених значень через забруднення, рукавички повинні бути використані протягом всієї процедури випробувань при роботі з флаконами реагентів, планшетом, піпетками і т.д. Крім того, всі підвищені значення повинні бути підтвержені повторним тестуванням.

Антитіла Анти-реагенту (людське анти-мишаче антитіло (НАМА) або Гетерофільні антитіла) у зразку пацієнта можуть іноді заважати аналізу, хоча конкретні блокуючі агенти включені в буфері.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Концентрації SCC були визначені цим набором у 175 здорових донорів. Нижня і верхня крайності нормального діапазону були вивчені за допомогою непараметричної статистичної обробки, рекомендованої IFCC. Референсний інтервал містить центральну 95% частку від еталонного розподілу. Верхня межа була відповідно оцінена як 97.5% верхньої фракції.

	Mean (µg/L)	SD (µg/L)	Median (µg/L)	Range (µg/L)	Upper reference limit (µg/L)
Healthy blood donors n=175	0.58	0.24	0.54	0.16–1.5	1.2 µg/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 концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського SCC і 18 різних комбінацій реагентів CanAg SCC EIA. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль.

Зразок	N	Середня конц. мкг/л	В аналізі SD, мкг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, мкг/л	Між днями CV, %
SCC 1	80	2.62	0.05	1.9	0.04	1.3
SCC 2	80	7.77	0.16	2.0	0.15	1.9
SCC 3	80	17.7	0.34	1.9	0.20	1.1
SCC 4	80	30.2	0.71	2.4	0.38	1.3

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору складала ≤ 0.3 мкг/л і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

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

Відновлення

Насичені зразки сироватки були приготовлені додаванням антигену людського SCC до нормального зразка сироватки. % відновлення антигену був знайдений в діапазоні 90-110%.

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 50 000 мкг/л. **ПРИМІТКА:** У зразках з дуже високими значеннями колір субстрату буде змінюватися від синього до зеленуватого (і зрештою жовтого для зразків з дуже високими значеннями). Це призведе до хибно низької оптичної щільності при 620 нм, а в крайніх випадках щільність може перебувати в межах калібрувальної кривої виглядати як хук-ефект.

Лінійність

Зразки пацієнтів серійно розводили з нормального людською сироваткою і аналізували. Отримані значення були в межах 90-110% від очікуваних значень.

Специфічність

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

Порівняння методів

CanAg SCC EIA в порівнювали з Imx SCC MEIA.

Для 72 зразків людини значення знаходились в межах 0-4 мкг/л,

лінійний регресійний аналіз результатів показав:

$$\text{CanAg SCC} = 1,02 \times \text{Imx SCC} + 0.03 \quad r = 0.86$$

Для 138 зразків людини значення знаходились в межах 0-50 мкг/л,

лінійний регресійний аналіз результатів показав:

$$\text{CanAg SCC} = 0,82 \times \text{Imx SCC} + 0.06 \quad r = 0.98$$

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