

НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА CA242 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

101-10, CanAg CA242 EIA

Каталог. № : 101-10

Методика от 04-2013

Количество : 96

Производитель: **Fujirebio Diagnostics, Inc., (Швеция)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения ракового антигена CA242 в сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

Онкомаркер CA242 определяется моноклональными антителами к CA242. Химическая структура антигенных детерминант точно неизвестна, но они имеют структуру сиаловых углеводов. В сыворотке CA242 находится в том же муциновом комплексе, что и CA50 и CA19-9. Таким образом, CA242 связан, но не идентичен с CA19-9. Уровни CA242 низки у здоровых людей и пациентов с доброкачественными заболеваниями, а повышенные уровни обнаруживаются у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта.

Тест CA242 может быть использован для диагностики и контроля лечения пациентов с известными или подозреваемыми желудочно-кишечными карциномами. Набор CA 242 не должен замещать любые принятые методы диагностики опухолей, но может использоваться как дополнение к существующим клиническим и лабораторным методам.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на прямой "сэндвичевой" технологии. Стандарты и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-CA242 моноклональными антителами в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. В процессе инкубации антиген CA242, содержащийся в стандартах или образцах пациентов, адсорбируется на покрытых стрептавидином ячейках микропланшета с биотинилированными анти-CanAg Mab. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена, меченой CA242 Mab, которая реагирует с местами связывания CA 242 на связавшихся CanAg антигенах. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена CA242, присутствующему в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере при 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора). Стандартные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого стандарта. Концентрация CA242 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

РЕАГЕНТЫ

- Каждый набор содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на упаковке.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Хранить набор при 2-8°C. Не замораживать.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были загрязнены, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и хранятся и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2-8°C) после использования.

Компонент	Количество	Хранение и стабильность после первого использования
Микропланшет	1 планшет	2-8°C до истечения срока годности

12x8 микроячеек, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Стандарты CA242 5 флаконов, лиофилизированные	2-8°C до истечения срока годности
CA242 0 Ед/мл 0.75 мл	
CA242 15 Ед/мл 0.75 мл	
CA242 50 Ед/мл 0.75 мл	
CA242 100 Ед/мл 0.75 мл	
CA242 150 Ед/мл 0.75 мл	

Готовы к использованию. Стандарты находятся в солевом растворе Трис-буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.05% азидом натрия в качестве консерванта.

Контроли CA242 2 флакона	2-8°C до истечения срока годности
---------------------------------	-----------------------------------

CA242 контроль 1	0.75 мл
CA242 контроль 2	0.75 мл

Готовы к использованию. Контроли находятся в солевом растворе Трис-буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.05% азидом натрия в качестве консерванта.

Биотин/анти-CA242	1 фл. 15 мл	2-8°C до истечения срока годности
--------------------------	-------------	-----------------------------------

Биотин анти-CA242 моноклональные антитела мыши, ≈ 1,5 мкг/мл. Содержит фосфатный буфер (pH 7.75), бычий сывороточный альбумин, бычий иммуноглобулин, блокирующий реагент, детергент, инертный красный краситель и 0.05% азид натрия в качестве консерванта.

Трейсер	1 фл. 0.75 мл	2-8°C до истечения срока годности
----------------	---------------	-----------------------------------

Сток-раствор конъюгата HRP с анти-CA242 моноклональными антителами мыши, ≈ 40 мкг/мл. Содержит консерванты. Перед использованием должен быть смешан с разбавителем трейсера.

Разбавитель трейсера	1 фл. 15 мл	2-8°C до истечения срока годности
-----------------------------	-------------	-----------------------------------

Готовый к использованию солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим глобулином, бычьим иммуноглобулином, детергент, инертным голубым красителем и 0.01% МИТ в качестве консерванта.

Субстрат ТМБ	1 фл. 12 мл	2-8°C до истечения срока годности
---------------------	-------------	-----------------------------------

Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и ТМБ.

Сток-раствор	1 фл. 15 мл	2-8°C до истечения срока годности
---------------------	-------------	-----------------------------------

Готовая к использованию. 0.12M соляная кислота.

Промывочный концентрат	1 фл. 50 мл	2-8°C до истечения срока годности
-------------------------------	-------------	-----------------------------------

Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой. Содержит ТРИС солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта.

Показатели нестабильности реагентов

Субстрат ТМБ должен быть бесцветным или слабо голубоватым. Голубая окраска свидетельствует о том, что реагент разложился, и его следует выбросить.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор для диагностики *in vitro*.

- Только для профессионального использования.
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 департамента Здоровья и Человеческих ресурсов США по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.
- Обращайтесь с пробами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Реагенты содержат азид натрия (NaN₃) в качестве консерванта. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью с образованием взрывоопасных азидов металла. При утилизации смыть с большим количеством воды.
- Следуйте национальным руководствам по утилизации биологических отходов.

Предостережения

Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазмы. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

СБОР ОБРАЗЦОВ

Набор разработан для использования сыворотки. Соберите кровь из вены, позвольте свернуться, отделите сыворотку центрифугированием. Образцы могут храниться при 2-8°C в течение 24 часов. Для более длительного хранения аликвот образцов рекомендуется -20°C. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8°C в течение ночи и затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не поставляемые с набором

1. **Шейкер для микропланшет.**
Встряхивание должно быть средним или энергичным, приблизительно 700-1100 движений в минуту.
2. **Устройство для промывки планшет.**
Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1, 3 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл/лунку/цикл.
8-миканальная пипетка с одноразовыми пластиковыми наконечниками для пипетирования 350 мкл рекомендуется если не используется автоматический вошер.
3. **Микропланшетный ридер** с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания от 0 до 3.0.
4. **Полуавтоматические пипетки** с одноразовыми пластиковыми наконечниками для раскапывания микролитровых и миллилитровых объемов. 8-канальная пипетка для раскапывания 100 мкл желательна, но не обязательна.
5. **Дистиллированная или деионизированная вода.**
Для приготовления Промывочного Раствора.

Замечания по протоколу анализа

1. Для получения хороших результатов важно хорошо понимать настоящую методику и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-28°C). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-28°C. Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны вручную.
3. Перед раскапыванием калибраторов, контролей и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Необходима тщательная промывка стрипов. Убедитесь в том, что каждая ячейка заполняется полностью, что аспирация жидкости между циклами и в конце полная, и что ячейки сухие. Если осталась часть жидкости, переверните планшет на фильтровальную бумагу и легко постучите по ней.
- Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора. Нельзя надолго оставлять промывочное устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться и давать в дальнейшем неполную промывку.

5. Во время работы с субстратом ТМБ убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники. Если субстрат ТМБ переносится из своего флакона, используйте только тщательно вымытый сосуд или предпочтительно одноразовый пластиковый флакон для предотвращения загрязнения реагентов.
6. Правильно используйте пипетки с наконечниками во время раскапывания образцов и реагентов. Избегайте прикосновения к стрипу или поверхности жидкости и переноса реагента из лунки в лунку. Это особенно важно при работе с субстратом ТМБ.

МЕТОДИКА

Приготовление реагентов Стабильность приготовленного реагента

Промывочный раствор 2 недели при 2-25°C
в герметичном контейнере

Налейте 50 мл промывочного концентрата в чистый сосуд и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения буферного промывочного раствора.

Рабочий раствор трейсера 3 недели
при 2-8°C

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера смешением 50 мкл раствора трейсера с 1 мл разбавителя трейсера для одного стрипа (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера (мкл)	Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое раствора трейсера во флакон с разбавителем трейсера и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера перенесен во флакон с разбавителем трейсера.

Замечание: Рабочий раствор трейсера стабилен 3 недели при хранении при 2-8°C. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

Процедура анализа

Проводите каждое измерение стандартов, контролей и проб пациентов в дублях. Стандартная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть доведены до комнатной температуры (20-28°C).

1. Приготовьте Промывочный раствор и рабочий раствор трейсера. Важно использовать чистую посуду. Тщательно следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. Поместите неиспользуемые стрипы в пластиковый пакет и закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте 25 мкл стандартов CA242 (ст), контролей (к) и проб пациентов (обр) в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т.д.
A	ст. 0	ст. 150	обр. 2		
B	ст. 0	ст. 150	обр. 2		
C	ст. 15	к. 1	обр. 3		
D	ст. 15	к. 1	и т.д.		
E	ст. 50	к. 2			
F	ст. 50	к. 2			
G	ст. 100	обр. 1			
H	ст. 100	обр. 1			

4. Добавьте 100 мкл биотин-анти-CA242 раствора в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте соприкосновения наконечников пипетки со стрипом или поверхностью жидкости и переноса реагента из лунки в лунку.

- Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 10 минут) при комнатной температуре (20-28 °C) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшет.
- После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 "Замечаний по протоколу анализа".
- Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл рабочего раствора трейсера, в той же последовательности, как в шаге 4.
- Инкубируйте держатель со стрипами в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-28 °C) с постоянным перемешиванием.
- После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п.4 "Замечаний по протоколу анализа".
- Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую ячейку, в той же последовательности, как в п.4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю ячейку не превышало 5 минут.
- Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
- Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена как описано в шаге 13.

- Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую ячейку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измерения

Данным методом СА242 ЕІА могут быть измерены концентрации в диапазоне от 1 до 150 Ед/мл. Если концентрация СА242 в образце превышает измеряемый диапазон, образец необходимо развести нормальной человеческой сывороткой и повторно исследовать.

ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотку, используемую для разведения, также необходимо проанализировать вместе с образцом, для определения уровня эндогенного СА242 (см. «Расчет результатов»).

Контроль качества

Для контроля достоверности анализа используют Контроль 1 и Контроль 2. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.

Если контрольные результаты не укладываются в указанный диапазон, тщательно проверьте все реагенты и фотометр и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Контрольный материал

Так как не существует референс-материалов для антигена СА242, стандарты прокалиброваны против внутреннего референс-стандарта.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если используется ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого стандарта СА242, указанную на флаконах.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод построения кривой кубический сплайн. Стандарт 0 должен быть включен в стандартную кривую со значением 0 нг/л.
- Метод построения кривой гладкий сплайн. Стандарт 0 должен использоваться как бланк
- Интерполяция от точки к точке. Стандарт 0 должен быть включен в кривую со значением 0 нг/л.
- Квадратичная регрессия. Стандарт 0 должен быть включен в кривую со значением 0 нг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов стандартная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого стандарта против соответствующих концентраций СА242 (в Ед/мл) (см. рисунок ниже). Значения концентраций СА242 в образцах для каждого пациента находятся по калибровочной кривой.

См. образец калибровочной кривой в оригинале инструкции.

Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Образец	Значения стандартов	Значения поглощения (А)	СА242 Ед/мл
Стандарт 0	0 Ед/мл	0.050	
Стандарт 15	15 Ед/мл	0.390	
Стандарт 50	50 Ед/мл	1.107	
Стандарт 100	100 Ед/мл	1.922	
Стандарт 150	150 Ед/мл	2.617	
Образец А		0.410	16.1
Образец В		1.636	80.9

Расчет результатов с разбавлением образцов

Если образец дает значение СА242 больше 150 Ед/мл, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 нормальной человеческой сывороткой.

1:10 разбавление = 50 мкл образца + 450 мкл разбавителя образцов

Концентрация СА242 в неразбавленных образцах рассчитывается следующим образом:

Разбавление 1/10: $10 \times [\text{Измеренное значение} - 0.9 \times \text{концентрации СА242 в разбавителе образцов}]$.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Уровни СА242 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор СА242 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний, и СА242-тест не должен замещать другие клинические исследования.

Анти-реагентные антитела (как анти-мышинные антитела (НАМА) или гетерофильные антитела) в образцах пациента могут иногда влиять на результаты исследования, несмотря на добавление специфических блокирующих агентов в буфера.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрации СА242 были определены этим набором в 184 сыворотках (97 женщин и 87 мужчин) здоровых пациентов. Диапазон составил $8,5 \pm 7,6$ Ед/мл. Нижняя и верхняя границы нормального диапазона оценивались согласно рекомендациям ІFCC для непараметрического статистического анализа и определены как 2,5% (нижний) и 97,5% (верхний) фрактили. Референс-интервал определен как 95%.

Фракция Референс-граница (Ед/мл)

2,5-й (нижний) 0

97,5-й (верхний) 29

У 93% здоровых доноров значение было ≤ 20 Ед/мл.

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, отбор пациентов и т.д.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Воспроизводимость оценивалась согласно NCCLS EP5-A с использованием 4 уровней концентраций пулированной замороженной сыворотки с добавлением человеческого СА242. Каждый образец был произвольно пипетирован ($n=2/\text{анализ}$) и проанализирован дважды каждый день в течение 20 дней подряд. Анализ проводился 42 месяца не менее чем тремя лаборантами и с использованием 20 различных наборов CanAg СА242. Воспроизводимость показана в таблице:

Образец	Повторы	Значение	SD (Ед/мл) внутри серии	CV% (Ед/мл) внутри серии	SD (Ед/мл) между сериями	CV% (Ед/мл) между сериями
1	80	16,2	0,67	4,1	0,39	2,4
2	80	48,4	1,93	4,0	1,82	3,8
3	80	79,5	2,99	3,8	2,46	3,1
4	80	125	5,81	4,7	2,74	2,2

Предел обнаружения (чувствительность)

Предел обнаружения для данного набора составил < 1 Е/мл и определен как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта плюс 2 стандартных отклонения.

$$\frac{2 \times \text{SD Стандарта 0}}{\text{OD Стандарта 15} - \text{OD Стандарта 0}} \times 15 \text{ Ед/мл}$$

Извлечение

Пиковые образцы сыворотки были приготовлены добавлением аликвоты образца с сильно повышенным значением CA242 к нормальному образцу сыворотки. % извлечения антигена был найден в диапазоне 87-107%.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 150 000 Ед/мл.

Замечание: в пробах с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый (и даже желтый при очень высоких концентрациях). Это приводит к ложно низкой оптической плотности при 620 нм и в экстремальных случаях оптическая плотность может падать в пределах стандартной кривой, что может быть расценено как Хук-эффект.

Линейность

Пробы пациентов были разбавлены разбавителем образцов и проанализированы. Полученные значения составили 97-108% от ожидаемых значений.

Специфичность

	Концентрации с незначительным влиянием (± 10 %)
Липемия	8 мг/мл
Билирубин, несвязанный	0.6 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Сравнение методов

CanAg CA242 EIA сравнили с CA242 Delfia. Были проанализированы 145 образцов в диапазоне значений 0-250 Ед/мл и был получен следующий результат:

CanAg CA242 EIA = 1.02 x CA242 Delfia – 1.1 $r = 0/99$

ГАРАНТИИ

Характеристики набора, представленные выше, получены по этой методике. Любые изменения или модификации методики не рекомендуются производителем. На такие ситуации гарантии производителя не распространяются.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com