

НАБОР

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА CA15-3 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

200-10, CanAg CA15-3 EIA

Каталог. № : 200-10
Количество : 96
Производитель: **Fujirebio Diagnostics, Inc., (Швеция)**

Методика от 06-2009



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 ассоциированного антигена (CA15-3) в сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

MUC-1 антиген представляет собой расположенный на мембране гликопротеин муцинового типа, который находится в злокачественных и нормальных эпителиальных клетках определенных органов, таких, как молочная железа, легкие, яичники и поджелудочная железа. Апопротеин MUC-1 содержит трансмембранный домен, цитоплазматический домен и экстрацеллюлярный домен с высоким содержанием углеводов. Экстрацеллюлярный домен характеризуется полиморфизмом, в котором задействован участок из 20 аминокислот (VNTR полиморфизм). Антиген MUC-1 рака молочной железы (CA 15-3) секретируется в опухолевых клетках и может быть использован как серологический маркер рака молочной железы. Данная тест-система основана на использовании двух моноклональных антител: Ma695, узнающем сialiрированный углеводный эпитоп, экспрессирующийся на муцине, и Ma552 – как маркере, специфичном к гептапептиду TRPAPG белкового скелета.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на прямой «сэндвичевой» технологии. Стандарты, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-CA15-3 моноклональными антителами и трейсером, меченым пероксидазой хрена, в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. 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 CA15-3, 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 CA15-3 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- 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.
- Храните набор при 2-8 °С не замораживая.
- После открытия реагенты стабильны при указанных в таблице ниже условиях, если обеспечивается отсутствие контаминации и хранение в оригинальной посуде и строгое следование настоящей инструкции.

Компонент	Количество	Хранение и стабильность после первого открывания
Микропланшет	1 планшет	2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 микроячеек, покрытых стрептавидином в пакете из алюминиевой фольги, содержит осушитель. Плотно закрывайте пакет для избежания увлажнения.

Стандарты CA15-3 5 флаконов 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете

CA15-3 0	0 Ед/мл	0.75 мл
CA15-3 15	15 Ед/мл	0.75 мл
CA15-3 50	50 Ед/мл	0.75 мл
CA15-3 125	125 Ед/мл	0.75 мл
CA15-3 250	250 Ед/мл	0.75 мл

Готовы к использованию. Стандарты MUC-1 антигена находятся в солевом растворе Трис-НСl буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% метил-изотиазолоном (МИТ) в качестве консерванта.

Контроли CA15-3 2 флакона 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете

CA15-3 контроль 1	0.75 мл
CA15-3 контроль 2	0.75 мл

Готовы к использованию. MUC-1 антиген находится в солевом растворе Трис-НСl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.01% метил-изотиазолоном (МИТ) в качестве консерванта.

Биотин Анти -CA15-3 1 фл. 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете
15 мл

Биотин анти-CA15-3 моноклональные мышинные антитела, ~ 2.5 мкг/мл. Готовый к использованию солевой раствор фосфатного буфера (рН 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим иммуноглобулином, блокирующими агентами, детергентами, инертным синим красителем и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Перед использованием необходимо смешать с трейсером-пероксидазным конъюгатом.

Трейсер, Анти-Са 15-3 HRP 1 фл. 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете
0.75 мл

Концентрат раствора пероксидазы хрена, конъюгированной с анти-CA15-3 моноклональными антителами мыши, ~ 50 мкг/мл. Содержит консерванты. Перед использованием необходимо смешать с Биотин Анти -CA15-3.

Разбавитель образцов 2 фл. 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете
50 мл

Готовый к использованию раствор, содержащий Трис-НСl забуференный солевой раствор с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Дополнительный разбавитель образцов может быть заказан: "Разбавитель образцов CA15-3 EIA", номер продукта № 200-24, содержит 50 мл.

Субстрат ТМБ 1 фл. 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете
12 мл

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

Стоп-раствор 1 фл. 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете
15 мл

Готовая к использованию 0.12 М соляная кислота.

Промывочный концентрат 1 фл. 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на планшете
50 мл

Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой. Содержит забуференный ТРИС-НСl 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.
- 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 образцы рекомендуются хранить при -20°C или ниже. Не использовать пробирки, содержащие гель. 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

- Шейкер для микропланшет.**
Встряхивание должно быть средним или энергичным. Продольный шейкер должен давать около 200 движений в минуту, орбитальный - 700-900/минуту.
- Устройство для промывки планшет.**
Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять от 1 до 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл/лунку/цикл или полуавтоматическое устройство, соединенное с вакуумным или водоструйным насосом.
- Микропланшетный ридер** с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания от 0 до 3.0.
- Полуавтоматические пипетки** с одноразовыми пластиковыми наконечниками для откапывания микрообъемов жидкостей 25, 50 и 100 мкл, 8-канальная пипетка для откапывания 100 мкл желательна, но не обязательна.
- Дистиллированная или деионизированная вода.** Для приготовления Промывочного раствора.

Замечания по протоколу анализа

- 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.
- Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25°C). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25°C. Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны вручную.
- Перед откапыванием стандартов и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
- 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. (рекомендуется объем не менее 400 мкл для автоматической промывки и не менее 350 мкл – для ручной промывки) Если осталась часть жидкости, переверните планшет на фильтровальную бумагу и легко постучите по ней.
Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться и давать в дальнейшем неполную промывку.
- 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.
- Правильно используйте пипетки с наконечниками во время откапывания 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 (20-25°C).

- Приготовьте Промывочный раствор и рабочий раствор трейсера. Важно использовать чистую посуду. Тщательно следуйте инструкции.
- Разбавьте образцы 1:41 смешиванием 25 мкл образцов и 1 мл разбавителя образцов. **Замечание:** стандарты и контроли **не должны** разбавляться.
- 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.
- Добавьте 25 мкл стандартов CA15-3 (ст.), контролей (к) и разбавленных проб пациентов (обр.) в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т.д.
A	ст. 0	ст. 250	обр. 2		
B	ст. 0	ст. 250	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. 125	обр. 1			
H	ст. 125	обр. 1			

- Добавьте 100 мкл раствора антител в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте касания стрипов или поверхности жидкости.
- Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (\pm 5 минут) при комнатной температуре (20-25°C) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшет.
- После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 "Замечаний по протоколу анализа".
- Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл ТМБ (субстрата пероксидазы хрена), в той же последовательности, как в шаге 5. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю ячейку не превышало 5 минут.
- Инкубируйте держатель со стрипами в течение 30 минут (\pm 5 мин.) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием.
- 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 10.

Альт. 10. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую ячейку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измерения

Диапазон измерения данного набора 1-250 Ед/мл. Если образец дает значение СА15-3 больше 250 Ед/мл, необходимо разбавить его в соотношении 1/400 или 1/4000 разбавителем образцов перед анализом.

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.

Контрольные материалы

Так как не существует референс-материалов для антигена MUC-1 (СА 15-3) антигена, 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 СА15-3.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Регрессия Cubic Spline. Стандарт А (0 Ед/мл) должен использоваться как стандарт со значением 0 Ед/мл.
- Регрессия сглаженный Spline. Стандарт А (0 Ед/мл) должен использоваться как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Стандарт А должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.
- Квадратичная регрессия. Стандарт А должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.

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 СА15-3 (в Ед/мл) (см. рисунок ниже). Значения концентраций СА15-3 в образцах для каждого пациента находятся из калибровочной кривой.

Если образец (разбавленный в 1/41) дает значение СА15-3 больше 250 Ед/мл, необходимо разбавить его еще дополнительно в соотношении 1/10 или 1/100 разбавителем образцов перед анализом.

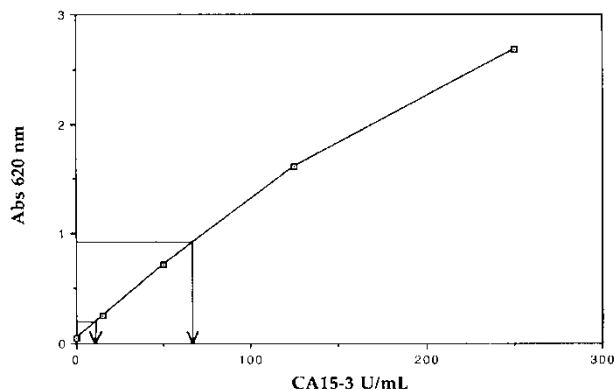
1: 10 разбавление = 50 мкл образца + 450 мкл разбавителя образцов
1:100 разбавление = 50 мкл разбавленного 1:10 + 450 мкл разбавителя образцов

Концентрация СА15-3 в неразбавленных образцах рассчитывается следующим образом:

Разбавление 1/10: 10 x Измеренное значение
Разбавление 1/100: 100 x Измеренное значение

Пример (не используйте эту кривую для расчета результатов)

Образец	Значения стандартов	Значения поглощения (А)	СА15-3 Ед/мл
Стандарт 0	0 Ед/мл	0.044	
Стандарт 15	15 Ед/мл	0.252	
Стандарт 50	50 Ед/мл	0.723	
Стандарт 125	125 Ед/мл	1.612	
Стандарт 250	250 Ед/мл	2.680	
Образец А		0.241	14.1
Образец В		0.895	63.1



ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Уровни СА15-3 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор СА15-3 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний и СА15-3-тест не должен замещать другие клинические исследования.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные значения: у здоровых женщин-доноров (51 женщина) составили 15 Ед/мл со стандартным отклонением 6.8. Медиана составила 13,8 с диапазоном 6-36 Ед/мл. Нижняя и верхняя границы нормального диапазона оценивались согласно рекомендациям IFCC для непараметрического статистического анализа и определены как 2,5% (нижний) и 97,5% (верхний) квантили. Референс-интервал определен как 95% доверительный интервал. N=51

Фракция	Референс-граница (Ед/мл)
2,5-й (нижний)	7
97,5-й (верхний)	36

94% здоровых женщин имели значения ниже 30 Ед/мл. Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, отбор пациентов и т.д.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Точность

Воспроизводимость оценивалась согласно NCCLS EP5-A с использованием 4 уровней концентраций пулированной замороженной сыворотки с добавлением человеческого СА15-3. Каждый образец был произвольно пипетирован (n=2/анализ) и проанализирован дважды каждый день в течение 20 дней подряд. Анализ проводился 40 месяцев не менее чем тремя лаборантами и с использованием 20 различных наборов CapAg СА15-3 Точность 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	15,8	0,55	3,5	1,16	7,3
2	80	57,0	1,73	3,0	6,37	11
3	80	78,6	2,93	3,7	5,29	6,7
4	80	148	4,86	3,3	8,37	5,6

Предел обнаружения (чувствительность)

Предел обнаружения для данного набора составил < 1 Ед/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 СА15-3 к нормальному образцу сыворотки. % извлечения антигена был найден в диапазоне 95-110%.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 7500 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 93-102 % от ожидаемых значений.

Специфичность

	Концентрации с незначительным влиянием ($\pm 10\%$)
Липемиа	10 мг/мл
Билирубин, несвязанный	0.6 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

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.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА (CA15-3)

Кат. N 200-10 - 96 тестов

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Смешивайте компоненты прямо перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/Планшет	Действия
1. Приготовить промывочный раствор	Концентрат промывочного раствора	Разбавить 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной воды.
Приготовление раствора антител	Трейсер Биотин анти-CA15-3	Смешать 50 мкл трейсера и 1 мл Биотин анти-CA15-3 соответственно: № стрипа Трейсер 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
2. Разбавить образцы	Разбавитель образцов Образцы	Разбавить образцы и контроли 1:41 смешением 25 мкл образца с 1 мл разбавителя образцов.
3. Промывка	Планшет	Промыть каждую ячейку один раз промывочным раствором.
4. Добавить стандарты, контроли и разбавленные образцы	Стандарты 0, 15, 50, 125, 250	25 мкл в каждую ячейку
5. Добавить раствор антител	Раствор антител	100 мкл в каждую ячейку
6. Инкубация	Планшет	2 часа, встряхивая при комнатной температуре
7. Промывка	Планшет	Промыть каждую ячейку 6 раз промывочным раствором
8. Добавить ТМБ субстрат	ТМБ субстрат	100 мкл в каждую ячейку
9. Инкубация	Планшет	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
10. Считывание	Планшет	620 нм
Альт.10. Добавить стоп-раствор	Стоп-раствор	100 мкл в каждую ячейку
Альт.11. Инкубация	Планшет	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
Альт.12. Считывание	Планшет	Считать при 405 нм в течение 15 минут