

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА CA125 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

400-10, CanAg CA125 EIA

Каталог. № : 400-10

Методика от 11-2012

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 CA125 в сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

См. оригинальный вариант инструкции.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на прямой "сэндвичевой" технологии. Стандарты и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-CA125 моноклональными антителами Ov197 (полученными из мыши) в покрытых стрептавидином ячеекх микропланшета. В процессе инкубации CA125, содержащийся в стандартах или образцах пациентов, адсорбируется на покрытых стрептавидином ячеекх микропланшета с биотинилированными анти-CA125 моноклональными антителами. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена меченой анти-CA125 моноклональными антителами Ov185. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и проходит ферментная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена CA125, присутствующему в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере при 620 нм (или возможно при 405 нм после добавления стоп-раствора). Стандартные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого стандарта. Концентрация CA125 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Каждый набор содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора проставлен снаружи коробки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов и наборов.
- Храните 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 |
|---|------------|
| Микропланшет | 1 плашка |
| 12x8 микроячеек, покрытых стрептавидином. Хранение до конца срока годности при 2-8°C. | |
| Стандарты CA125 | 5 флаконов |
| 0 Ед/мл | 8 мл |
| 10 Ед/мл | 0,75 мл |
| 40 Ед/мл | 0,75 мл |
| 200 Ед/мл | 0,75 мл |
| 500 Ед/мл | 0,75 мл |

Готовы к использованию. Стандарты находятся в солевом растворе Трис-НСI буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.05% азидом натрия в качестве консерванта. Стандарт 0 должен также использоваться для разбавления образцов. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

| | |
|------------------|-----------|
| Контроли CA125 | 2 флакона |
| CA125 контроль 1 | 0,75 мл |
| CA125 контроль 2 | 0,75 мл |

Готовы к использованию. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

Биотин Анти-CA125 1 фл. 15 мл

Раствор пероксидазы хрена анти-CA125 моноклональных антител мыши, ≈ 2 мкг/мл. Должен быть разбавлен перед использованием разбавителем трейсера. Содержит 0.05% азида натрия в качестве консерванта. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

HRP Анти-CA125 1 фл. 0.75 мл

Основной раствор HRP анти-CA125 моноклональных антител мыши, ≈ 30 мкг/мл. Содержит консерванты. Перед использованием развести с разбавителем трейсера.

Разбавитель трейсера 1 фл. 15 мл

Готовый к использованию солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим глобулином, мышиным иммуноглобулином, ТВИН 20 и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

Субстрат ТМБ 1 фл. 12 мл

Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и ТМБ. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

Стоп-раствор 1 фл. 15 мл

Готовая к использованию 0.12 М соляная кислота. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

Промывочный концентрат 1 фл. 50 мл

Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой. Содержит ТРИС-НСI солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта. Хранение до конца срока годности при 2-8°C.

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*.

- 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.
- Жвачные животные или свиньи не должны контактировать с набором или его остатками.
- Реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью с образованием взрывоопасных азидов металлов. При вылипании смывайте большим количеством воды.

Предостережения

Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазмы. И 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 И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

Набор разработан для использования сыворотки. Соберите кровь из вены, позвольте свернуться, отделите сыворотку или плазму центрифугированием. Гемолизированные, умеренно липемичные

или иктеричные образцы не влияют на результат анализа. Образцы, содержащие фибрин, сильно гемолизированные, сильно липемичные или мутные образцы могут давать неправильные результаты.

Образцы могут храниться при 2-8°C в течение 2 дней. 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 приведите образцы к комнатной температуре перед анализом.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не поставляемые с набором

1. Шейкер для микропланшет.

Встряхивание должно быть средним или энергичным. Продольный шейкер должен давать около 200 движений в минуту, орбитальный - 900-1100.

2. 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.

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 откапывания микрообъемов жидкостей 25, 50 и 100 мкл, 8-канальная пипетка для откапывания 100 мкл желательна, но не обязательна.

5. Дистиллированная или деионизированная вода.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

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 приведены к комнатной температуре (20-25°C). Для получения акуратных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25°C. Замороженные образцы после оттаивания должны быть тщательно, но аккуратно перемешаны. Не использовать вихревание или сильное перемешивание образцов и контролей.

3. Перед откапыванием стандартов 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 плашку 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.

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.

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

6. 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.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Промывочный раствор

Вылейте 50 мл промывочного концентрата в чистый сосуд и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения буферного промывочного раствора. Стабильность: 2 недели при 2-25°C в герметичном контейнере.

Рабочий раствор трейсера

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера смешением 50 мкл раствора трейсера с 1 мл разбавителя трейсера на стрип (см.

нижеприведенную таблицу и протокол). Стабильность: 3 недели при 2-8°C.

| 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 и проб пациентов в дублях. Стандартная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть приведены к комнатной температуре (20-25°C).

1. Приготовьте промывочный раствор и рабочий раствор трейсера. Важно использовать чистые контейнеры. Четко следуйте инструкциям.

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 CA125 (0, 10, 40, 200, 500), контролей (C1, C2) и проб пациентов в ячейки согласно следующей схеме:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 и т.д. |
|---|---------|---------|--------|---|----------|
| A | ст. 0 | ст. 500 | обр.2 | | |
| B | ст. 0 | ст. 500 | обр.2 | | |
| C | ст. 10 | К. 1 | и т.д. | | |
| D | ст. 10 | К. 1 | | | |
| E | ст. 40 | К. 2 | | | |
| F | ст. 40 | К. 2 | | | |
| G | ст. 200 | обр. 1 | | | |
| H | ст. 200 | обр. 1 | | | |

4. Добавьте 100 мкл биотин анти-CA125 раствора в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте касания стрипов или поверхности жидкости.

5. Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 10 минут) при комнатной температуре (20-28°C) с постоянным перемешиванием плашки на шейкере для микропланшет.

6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 "Замечаний по протоколу анализа".

7. Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл рабочего раствора трейсера, в той же последовательности, как в шаге 4.

8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-25°C) с постоянным перемешиванием.

9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п.4 "Замечаний по протоколу анализа".

10. 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 10 минут.

11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием плашки на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.

12. 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

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЯ

CapAg CA125 ИФА измеряет концентрации между 1,5 и 500 Ед/мл. Если ожидаемые концентрации CA125 выше диапазона измерения рекомендуется перед анализом разбавить образцы CA125 нулевым калибратором.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля. Необходимо, чтобы каждая лаборатория в качестве контролей приготовила свои собственные наборы сывороток с различным объемом анализируемого вещества.

Контрольный материал

Так как не существует референс-материалов для антигена CA125, 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 CA125.

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 (A), полученных для каждого стандарта против соответствующих концентраций CA125 (в Ед/мл) (см. рисунок в оригинале инструкции). Значения концентраций CA125 в образцах для каждого пациента находятся из калибровочной кривой.

Если образец дает значение CA125 больше 500 Ед/мл, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 или 1/100 нулевым стандартом.

1: 10 разбавление = 50 мкл образца + 450 мкл CA125 0 Калибратора.
1: 100 разбавление = 50 мкл разбавленного 1:10 + 450 мкл CA125 0 Калибратора.

Концентрация CA125 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 определения результатов)

| Образец | Значения стандарта | Значения поглощения (A) | CA125 Ед/мл |
|--------------|--------------------|-------------------------|-------------|
| Стандарт 0 | 0 Ед/мл | 0.047 | |
| Стандарт 10 | 10 Ед/мл | 0.116 | |
| Стандарт 40 | 40 Ед/мл | 0.298 | |
| Стандарт 200 | 200 Ед/мл | 1.269 | |
| Стандарт 500 | 500 Ед/мл | 2.218 | |
| Образец А | | 0.490 | 69,8 |
| Образец В | | 1.650 | 325 |

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Уровни CA125 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор CA125 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний и CA125-тест не должен замещать другие клинические исследования.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Среднее значение, полученное от 100 здоровых женщин-пациентов составило 14,7 со стандартным отклонением 7,7. Медиана составила 13,1 Ед/мл, в диапазоне 5,06-47,9 Ед/мл. Нижняя и верхняя конечности диапазона в норме были исследованы при использовании рекомендуемой непараметрической статистической обработки. Контрольный интервал содержит центральную 95% фракцию контрольной области. Контрольные границы

соответственно могут быть оценены как 2,5% (нижняя) и 97,5% (верхняя) фракции. Эти границы отделяют 2,5% фракцию значений в каждом остатке контрольной области. Непараметрические оценки: N=100

| Фракция | Контрольный диапазон |
|----------------|----------------------|
| 2,5 (нижняя) | 5 |
| 97,5 (верхняя) | 39 |

96% проанализированных здоровых женщин продемонстрировали значения ниже 35 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

Ниже показана (см. оригинал инструкции) типичная стандартная кривая и профиль коэффициента вариации, полученные на этом наборе. Профиль получен при случайном пипетировании стандартов в одну плашку, n = 10.

Точность

Воспроизводимость в пределах процедуры:

| Образец | Репликации | Среднее, Ед/мл | СО, Ед/мл | КВ, % |
|----------|------------|----------------|-----------|-------|
| CA 125 1 | 40 | 16,8 | 0,74 | 4,4 |
| CA 125 2 | 40 | 75,7 | 3,26 | 4,3 |
| CA 125 3 | 40 | 201 | 8,55 | 4,3 |
| CA 125 4 | 40 | 392 | 11,4 | 2,9 |

Воспроизводимость между сериями рассчитывалась из 3 отдельных анализов с 4 повторами каждого образца в течение 3 дней:

| Образец | Повторы | Значение, Ед/мл | СО, Ед/мл | КВ, % |
|----------|---------|-----------------|-----------|-------|
| CA 125 1 | 40 | 16,8 | 0,53 | 3,1 |
| CA 125 2 | 40 | 75,7 | 2,42 | 3,2 |
| CA 125 3 | 40 | 201 | 7,58 | 3,8 |
| CA 125 4 | 40 | 392 | 15,5 | 4,0 |

Предел обнаружения

Предел обнаружения для данного набора составил < 1.5 Ед/мл и определяется как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта плюс 2 стандартных отклонения согласно формуле:

$$\frac{2 \times \text{СО } 0 \text{ Калибратора} \times 10 \text{ Ед/мл}}{\text{ОП Калибратора } 10 - \text{ОП } 0 \text{ Калибратора}}$$

Извлечение

Образцы сыворотки были приготовлены добавлением антигена CA125 к нормальным образцам сыворотки. % извлечения антигена был обнаружен в диапазоне 100±15%.

Эффект Высокой дозы

Эффект высокой дозы не наблюдается для образцов с концентрациями до 50 000 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.

Линейность

Пробы пациентов были разбавлены разбавителем образцов и проанализированы. Полученные значения были получены от ожидаемых значений в диапазоне 100±15%.

Специфичность

Были проанализированы следующие вещества и концентрации, которые не оказались перекрестно реактивными с тестом.

| | Концентрации с незначительной (+/-10%) перекрестной реактивностью |
|------------------------------|---|
| Липемия | 4 мг/мл |
| Билирубин, неконъюгированный | 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.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com