



1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **DRG TM-CA 72-4 ELISA** предназначен для количественного определения CA 72-4 (TAG-72) в сыворотке и плазме крови человека.

Только для **in vitro** диагностики.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Метод основан на последовательном взаимодействии иммобилизованных и меченных пероксидазой антител с молекулами онкомаркера CA 72-4 на твердой фазе, отмывки не связавшихся компонентов и количественной его оценки по интенсивности окрашивания раствора субстрата. Величину абсорбции измеряют после остановки реакции на основной: 450 нм и референс: 620 нм длинах волн планшетного спектрофотометра.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.
- За более полной информацией об опасных веществах, входящих в состав набора, обращайтесь к паспорту безопасности данных для данного набора.
- Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы и определены как отрицательные для HIV I/II, HBsAg и HCV. Однако, все реагенты необходимо рассматривать как потенциальную биологическую угрозу.
- Избегать контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 М H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
- Не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курить, не пить, не использовать косметику во время работы с образцами и реагентами набора.
- Проводить анализ рекомендуется в одноразовых перчатках. Попадание инфекции в реагенты и образцы может привести к ошибочным результатам.
- Соблюдайте меры предосторожности. Анализ необходимо проводить в соответствии с правилами национальной биологической безопасности.
- Обращайте внимание на номер лота и срок хранения.
- Все указанные значения необходимо выполнять в соответствии с инструкцией набора. Наиболее оптимальных результатов анализа можно достичь путем использования градуированных пипеток.
- Не используйте реагенты из разных наборов. Рекомендуется не смешивать лунки различных планшет даже из одного лота. Наборы хранились в различных условиях во время транспортировки, поэтому характеристики связывания планшет могут показать различный результаты.
- В соответствии с правилами национальной безопасности, с химическими продуктами и использованными для анализа реагентами необходимо обращаться как с опасными веществами.
- Паспорт безопасности данных для данного продукта имеется в наличии в DRG Instruments GmbH.
- Паспорт безопасности данных соответствует требованиям: EU-Guideline 91/155 EC.

4 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (делимые) стрипы, 96 лунок

Лунки покрыты анти-CA 72-4 моноклональными антителами

2. **Стандарты (0-4)**, 5 флаконов по 0,5 мл, готовы к использованию
0, 3, 20, 100 U/ml

3. **Контроли** с высоким и низким уровнем СА 72-4 , 2 флакона (в лиофилизированном виде), по 0.5 мл каждый. см. „Подготовка реагентов“
Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетке флакона или в сертификате качества.
4. **Раствор для разведения образцов**, 1 флакон, 3 мл, готовый к использованию
5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию анти-72-4 антитела, меченные пероксидазой хрена см. „Подготовка реагентов“
6. **Субстратный раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию
7. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию содержит 0.5M H₂SO₄
Избегать контакта со стоп раствором. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
8. **40X концентрат промывочного буфера**, 1 флакон, 30 мл см. „Подготовка реагентов“

Внимание: Дополнительный раствор для разведения образцов имеется в наличии и предоставляется по требованию.

4.1.1 Необходимые материалы, не поставляемые с набором

- Микропланшетный спектрофотометр (450±10 нм) (например. DRG Instruments Микропланшетный Ридер).
- Микропипетки калиброванные переменного объема
- Фильтровальная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер
- Диаграммная бумага или программное обеспечение для обработки данных

4.2 Хранение и стабильность набора

При хранении при температуре 2-8°C реагенты сохраняют реактивность до истечения срока годности. Не рекомендуется использовать реагенты после истечения срока годности. Все открытые реагенты необходимо хранить при температуре 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Сразу после вскрытия фольгированного пакета его необходимо аккуратно запечатать.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Контроли

Добавить в каждый флакон с лиофилизированным контролем по 0.5 мл. дистиллированной воды, помешать и дать отстояться в течение 10 минут. Перед использованием перемешать содержимое флаконов несколько раз.

Внимание: Разведенные контроли необходимо разлить по аликвотам и хранить при температуре – 20°C.

Промывочный раствор

Развести 30 мл концентрированного промывочного раствора деионизированной водой (1170 мл) до конечного объема 1200 мл.

Разведенный промывочный раствор можно хранить в течение 2 недель при комнатной температуре.

4.4 Утилизация набора

Утилизацию набора необходимо проводить в соответствии с правилами национальной безопасности. Вся необходимая информация о данном продукте приводится в паспорте безопасности данных.

4.5 Поврежденные наборы

В случае сильного повреждения набора или его компонентов, необходимо в письменной форме уведомить об этом компанию DRG не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не рекомендуется использовать в проведении анализа. Их

необходимо хранить до принятия окончательного решения, после чего, ликвидировать в соответствии с официальными правилами.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Собрать кровь венопункцией в специальные контейнеры (например: Sarstedt Monovette # 02.1388.001). Дать крови отстояться при комнатной температуре до образования кровяного сгустка, отцентрифугировать ее и слить сыворотку. Образцы крови пациентов, подвергшихся накануне антикоагулянтной терапии, должны выстаиваться дольше.

Плазма:

Образцы цельной крови необходимо поместить в центрифужные пробирки с антикоагулянтами и отцентрифугировать сразу же после их отбора.

(для ЭДТА плазмы можно использовать Sarstedt Monovette – красный колпачок- # 02.166.001;
для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette – оранжевый колпачок - # 02.165.001;
для цитратной плазмы - Sarstedt Monovette – зеленый колпачок - # 02.167.001.)

5.2 Подготовка и хранение образцов

Контейнеры с образцами можно хранить до проведения анализа в течение 2 дней при температуре 2 °C to 8 °C. Для более длительного хранения (до 1 года) их необходимо заморозить до -20°C.

5.3 Разведение образцов

Протестированные образцы, показавшие значения абсорбции выше максимального стандарта, необходимо развести в 10 или 100 раз раствором для разведения образцов и протестировать заново.

Для подсчета концентрации должен учитываться фактор разведения.

Например:

- а) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотки + 90 мкл раствора для разведения образцов
(тщательно перемешать)
- б) разведение 1:100: 10 мкл раствор а) 1:10 + 90 мкл раствора для разведения образцов
(тщательно перемешать)

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Основные замечания

- Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры. Реагенты необходимо смешать без образования пены.
- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.
- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок / пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в ходдер и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Проведение анализа

Все стандарты, образцы и контроли должны исследоваться одновременно в дублях с тем, чтобы соблюдать одинаковые условия анализа.

1. Установите необходимое количество микротитровальных стрипов в рамку-держателя.
2. Внести по **20 мкл** каждого стандарта, контроля и образцов новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
3. Добавить по **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.

Тщательно перемешать содержимое лунок в течение 10 секунд. Крайне важно добиться полного их смешивания на этом этапе анализа .

4. Инкубировать в течение **120 минут** при комнатной температуре.
5. Вытряхнуть содержимое лунок в раковину. Промыть лунки 5 раз разведенным промывочным буфером (по 400 μ l на каждую лунку). Выстучать остатки капель из лунок на толстом слое фильтровальной бумаги.

Важно:

Чувствительность и точность данного анализа значительно зависит от тщательного проведения процедуры промывки!

6. Добавить по **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубировать в течение **30 минут** при комнатной температуре.
8. Остановить реакцию, добавив по **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
9. **В течение 10 минут** после остановки реакции измерить оптическую плотность на длине волны **450±10 нм** микропланшетного спектрофотометра.

6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения оптической плотности для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.
2. Построить стандартную кривую, нанося среднее значение оптической плотности, полученной от каждого стандарта в отношении к его концентрации со значением оптической плотности на вертикальной оси (Y) и концентрации на горизонтальной оси (X).
3. Используя среднее значение каждого образца определить соответствующую концентрацию из стандартной кривой.
4. Автоматический метод: Компьютерные программы, использующие кубический сплайн, 4 PL (4 Parameter Logistics) или Logit-Log в общем могут дать хороший результат.
5. Концентрацию образцов можно считать с этой стандартной кривой. Образцы с концентрациями, превышающими самое высокое значение, требуют дальнейшего разведения. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимания этот фактор разведения.

6.3.1 Пример стандартной кривой.

Представленные ниже значения оптических плотностей протестированных стандартов приведены лишь в качестве иллюстрации и не должны подменять собой конкретных результатов ИФА, получаемых в каждой лаборатории самостоятельно.

Стандарты	Оптическая плотность (A-450 nm)
Стандарт 0 (0 Ед/мл)	0.08
Стандарт 1 (3 Ед/мл)	0.19
Стандарт 2 (20 Ед/мл)	0.59
Стандарт 3 (50 Ед/мл)	1.16
Стандарт 4 (100 Ед/мл)	2.02

7 Ожидаемые значения

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные уровни и отклоняющиеся от нормы величины. Все участвующие в исследовании здоровые люди в количестве 55 человек были отнесены к нормальному диапазону. В пределы: 5 – 95перцентилей попали значения от 0 до 2.68 Ед/мл

В итоге проведенных изысканий были получены следующие данные:

Население	Число испытуемых	Медиана (Ед/мл)	Концентрация (Ед/мл)	5 - 95 процентиля (Ед/мл)
Здоровые мужчины и женщины	65	0.72	0.86	0 – 2.68

Приведенные в таблице данные вполне соответствуют установленным значениям cut-offs (< 4-6 Ед/мл).

Полученные результаты ИФА следует обязательно сопоставлять с данными других диагностических методов, т.к. сами по себе они не могут служить достаточным основанием для назначения протестированным пациентам тех или иных терапевтических процедур.

8. Контроль качества

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными положениями. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения надежности результатов. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты QC-Лаборатории приведены в сертификате качества, прилагаемом к набору. Значения и диапазоны так же указаны в сертификате качества, прилагаемом к данному лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать государственные и международные программы контроля качества с тем, чтобы обеспечить точность результатов.

Применяйте соответствующие статистические методы для исследования контрольных значений и отклонений. Если же результаты не совпадают с установленными допустимыми значениями контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные.

В этом случае проверьте следующие технические параметры: точность дозирования реагентов и проб, правильность настройки фотометра и промывающего устройства, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации.

После проверки вышеуказанных параметров, не обнаружив никаких ошибок, обратитесь к своему дистрибьютору или непосредственно в DRG.

9 ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон исследования

Диапазон исследования 0,79 – 100 Ед/мл.

9.2 Специфичность антител (Перекрестная реактивность)

Не было отмечено каких-либо перекрестных реакций при тестировании других белков.

9.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность, рассчитанная из средней величины оптической плотности и двух стандартных отклонений (двадцати повторных анализов) протестированного нулевого стандарта, составила 0,79 Ед/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Внутренняя точность тестирования

Внутриростовая вариабельность данных приведена ниже

Образец	Кол-во	Среднее (Е/мл)	КВ (%)
1	20	1.4	2.2
2	20	1.6	1.6
3	20	1.6	2.4

9.4.2 Серийная точность тестирования

Вариабельность данных между разными постановками анализов приведена в нижеприведенной таблице

Образец	Кол-во	Среднее (Е/мл)	КВ (%)
1	40	10.1	4.4
2	40	18.9	4.8
3	40	29.6	4.2

9.5 Восстановление

Для оценки восстановления в образцы, содержащие СА-72-4, вносили растворы этого онкомаркера известной концентрации в соотношении 1:1. При расчете ожидаемых концентраций аналита эндогенный и добавленный СА-72-4 суммировали и делили эту величину пополам для корректировки увеличившегося объема раствора. О восстановлении определяемого аналита судили по процентному соотношению измеренных и ожидаемых концентраций СА-72-4 (см. нижеприведенную таблицу).

		Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Е/мл]		3.6	8.1	9.4
Средний процент восстановления		99.3	98.2	98.8
Степень восстановления [%]	от	96.6	92.5	88.2
	до	102.1	105.8	106.8

9.6 Линейность

		Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Е/мл]		51.0	94.0	10.0
Средний процент восстановления		91.2	108.5	97.8
Степень восстановления [%]	от	86.3	106.4	86.0
	до	99.6	112.3	112.0

10 ОГРАНИЧЕНИЯ В ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОЦЕДУРЫ

10.1 Возможность перекрестных реакций

Отклонение от инструкции или внесение каких-либо модификаций в процедуру анализа может негативно сказаться на специфичности или чувствительности анализа. Никаких перекрестных реакций не было отмечено при тестировании этими наборами реагентов: гемоглобина (до 4 мг/мл), билирубина (до 0,5 мг/мл) и триглицеридов (до 30 мг/мл). Введение в процедуру анализа ГАМК и гетерофильных антител также не оказало заметного влияния на результаты ИФА. Тем не менее, чрезвычайно высокий титр ГАМК или гетерофильных антител может негативно сказываться на специфичности этого теста.

10.2 Влияние лекарственных аппаратов

До сегодняшнего дня не обнаружено никаких веществ – лекарственных препаратов, влияющих на измерение СА 72-4 в образце.

10.3 Хук-Эффект

Не было отмечено какого-либо негативного воздействия на прохождение иммунохимических реакций в этом тесте при введении высоких концентраций СА 72-4 вплоть до: до 6400 U/ml.