

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СА 72-4 В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ

RE54111, СА 72-4 ELISA

Каталог. № : RE54111
Количество : 96
Производитель: IBL (Германия)

Методика от 03-2015
Версия 8.0



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

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Назначение использования

СА 72-4 ИФА - иммуноферментный анализ для количественного *in vitro* определения СА 72-4 (TAG-72) в сыворотке и плазме.

1.2 Обобщения и объяснение (См. оригинал инструкции).

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Набор ИФА СА 72-4 представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) на основе принципа сэндвича. Микротитровальные лунки покрыты моноклональными мышинными антителами (клон СС49), направленными против уникального антигенного сайта на молекуле СА 72-4. Аликвота образца пациента, содержащего эндогенный СА 72-4, инкубируется в лунке вместе с ферментным конъюгатом антитела анти-СА 72-4 (клон В72.3) с пероксидазой хрена. После инкубации несвязанные компоненты вымываются. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации СА 72-4 в образце. При добавлении раствора субстрата, интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации СА 72-4 в образце пациента.

3. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для использования в *In-vitro* диагностике. Только для профессионального использования.
2. Все реагенты данного набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были протестированы и найдены отрицательными к ВИЧ 1/2, HbsAg и HCV, используя установленные процедуры. Тем не менее, обращаться со всеми реагентами как с потенциальным источником инфекции.
3. Перед началом проведения теста полностью и внимательно прочитать инструкцию. Использовать действующую версию инструкции, предоставленной с набором. Убедиться в том, что все понятно.
4. Планшет состоит из отрываемых стрипов. Неиспользованные лунки необходимо хранить при 2-8 °C запечатанными и использовать с поставляемым держателем.
5. Пипетирование образцов и реагентов проводить как можно быстрее и с одинаковыми интервалами для каждого шага.
6. Использовать резервуары только для одиночных реагентов. Это особенно касается емкостей для субстрата. Использование резервуара для раствора субстрата, который использовался для раствора конъюгата, может привести к окрашиванию раствора. Не возвращать реагенты обратно в пробирки, это может привести к загрязнению.
7. Тщательно смешивать содержимое лунок для получения хороших результатов теста. Не использовать микролунки повторно.
8. Не допускать высыхания лунок во время анализа; добавлять реагенты немедленно после завершения шагов промывки.
9. Позволить реагентам достичь комнатной температуры (21-26 °C) перед началом анализа. Температура влияет на результаты плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты анализа пациентов.
10. Никогда не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Не курить, не употреблять пищу и напитки, не наносить косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
12. Использовать одноразовые перчатки при работе с образцами и реагентами. Микробное загрязнение реагентов может привести к ложным результатам.

13. Следовать правилам лабораторной практики и соблюдать правила техники безопасности.
14. Не использовать просроченные реагенты.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться. Оптимальные результаты теста будут получены только при использовании калиброванных пипеток и микропланшетных ридеров.
16. Не смешивать и не использовать реагенты из разных партий. Рекомендуется не перемешивать лунки разных планшетов даже из одной партии. Наборы могли транспортироваться или храниться при разных условиях и связывающие характеристики планшетов могут отличаться.
17. Избегать контакта со *Стоп раствором*, содержащим 0.5M H₂SO₄. Это может вызвать раздражение или ожоги кожи.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, BND и/или MIT в качестве консервантов. В случае контакта с глазами или кожей немедленно промыть с большим количеством воды.
19. Субстрат ТМБ оказывает раздражающее действие на кожу и слизистые. В случае возможного контакта, промыть глаза водой и кожу мылом и водой. Вымыть загрязненные объекты перед их повторным использованием. При вдыхании выйти на свежий воздух.
20. С химикатами и приготовленными или использованными реагентами обращаться как с опасными отходами в соответствии с национальными правилами по биологической безопасности.
21. Реагенты данного набора, содержащие опасные материалы, могут вызвать раздражение глаз и кожи. За деталями обратиться к разделу ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ и этикеткам. Данные по безопасности данного продукта доступны на веб-странице IBL или по запросу непосредственно от IBL.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые материалы

1. **Микротитрационные лунки**, 12x8 (делимые), 96 лунок; Лунки покрыты антителом анти-СА 72-4 (моноклональным).
2. **Стандарт (Стандарт 0-4)**, 5 флаконов 0.5 мл, готовы к использованию; Концентрации: 0; 3; 20; 50; 100 Ед/мл Содержит консервант.
3. **Контроль (Низкий и высокий)**, 2 флакона (лиофилизированный), 0.5 мл каждый, см. "Подготовка реагентов" Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетках или в листе Контроля качества. Содержит консервант.
4. **Рабочий Буфер**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию, Содержит консервант.
5. **Ферментный Конъюгат 10X Концентрат**, 1 флакон, 1.4 мл, Антитела к анти-СА 72-4; HRP конъюгированные. Содержит нертуный консервант.
6. **Растворитель конъюгата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит консервант.
7. **Раствор Субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0.5 M H₂SO₄. Избегать контакта со Стоп раствором. Может вызвать раздражения кожи и ожоги.
9. **Промывочный Раствор**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрированный), см. "Подготовка реагентов".

Примечание: Дополнительный *Рабочий Буфер* для разбавления образцов доступен под заказ.

4.2 Требуемые, но не поставляемые материалы

- Считывающее устройство пластины микротитратора (450±10 нм).
- Калиброванные микропипетки различной точности.
- Впитывающая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов.

4.3 Условия хранения

При хранении при температуре 2-8 °C в нераспечатанной упаковке реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не используйте реагенты после этой даты. Открытые реагенты должны храниться при температуре 2-8 °C. Микротитровальные лунки должны храниться при температуре 2-8 °C. Как только упаковка была вскрыта, следует позаботиться, чтобы ее снова плотно закрыть. Открытые наборы сохраняют активность в течение двух месяцев при хранении, как описано выше.

4.4 . Подготовка реагентов

Привести все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре перед использованием.

Контроль

Восстановить лиофилизированное содержимое с 0.5 мл дистиллированной воды и оставить минимум на 10 минут. Перемешать несколько раз перед использованием.

Примечание: Восстановленные Контроли аликвотировать и заморозить при -20 °С.

Промывочный Раствор

Добавить деионизированной воды к 40X Концентрату Промывочного Раствора.

Развести 30 мл концентрированного Промывочного Раствора со 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Разведенный Промывочный Раствор стабилен в течение 2 недель при комнатной температуре.

Ферментный конъюгат

Развести концентрат Ферментного Конъюгата 1:10 в Разбавителе Конъюгата. Стабильность приготовленного раствора: 1 неделя при 2-8 °С в запечатанном контейнере.

Пример:

Если используется вся пластина, развести 1.2 мл Ферментного конъюгата с 10.8 мл Растворителя Конъюгата до объема 12 мл.

Если весь планшет не используется, приготовить необходимое количество Ферментного Конъюгата добавлением 100 мкл 10X концентрата Ферментного Конъюгата к 0.9 мл Разбавителя Конъюгата на одну полоску (см. таблицу ниже):

Количество полосок	Концентрат Ферментного Конъюгата 10X (мкл)	Растворитель Конъюгата (мл)
1	100	0.9
2	200	1.8
3	300	2.7
4	400	3.6
5	500	4.5
6	600	5.4
7	700	6.3
8	800	7.2
9	900	8.1
10	1000	9.0
11	1100	9.9
12	1200	10.8

4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна быть проведена в соответствии с национальными предписаниями компетентных служб. Специальная информация для данного продукта приведена в паспорте по технике безопасности.

4.6 Поврежденные тестовые наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, производитель должен быть информирован в письменной форме не позднее одной недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться для тестового запуска. Они должны быть сохранены до принятия окончательного решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с предписаниями компетентных служб.

5. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

В данном анализе могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТК- или гепариновая плазма).

Не использовать гемолитические, иктерические или липемические образцы.

Замечание: Не использовать образцы, содержащие NaN_3 .

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Провести забор крови из вены (например, Sarstedt Monovette для сыворотки), дать свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Пациентам, проходящим антикоагулянтную терапию, может потребоваться больше времени для свертывания.

Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт (например, Sarstedt Monovette, с соответствующей подготовкой плазмы), и центрифугирована сразу после сбора.

5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрыты крышками и храниться при температуре 2-8 °С до 5 дней до проведения анализа.

Если образцы не могут быть проанализированы сразу после забора, хранить их замороженными при -20 °С или ниже. Рекомендуется быстро заморозить и разморозить обрабатываемые образцы.

5.3. Разведение образцов

Если в изначальном анализе образец имеет концентрацию, превышающую значение наивысшего Стандарта, образец может быть разбавлен 1:10 или 1:100 Рабочим Буфером и проанализирован повторно.

Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

Пример:

- разведение 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл Рабочего Буфера (тщательно перемешайте)
- разведение 1:100: 10 мкл разведения а) 1:10 + 90 мкл Рабочего Буфера (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть приведены к комнатной температуре перед использованием. Все реагенты должны быть перемешаны без образования пены.
- После того как тест был запущен, все шаги должны быть завершены без перерыва.
- Использовать новые одноразовые наконечники для пипеток для каждого стандарта, контроля или образца во избежание перекрестного загрязнения.
- Поглощение является функцией времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в держателе и т.д. Это обеспечит одинаковые промежутки времени для каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура теста

Каждый прогон должен включать стандартную кривую.

- Закрепить необходимое количество лунок в держателе.
- Внести **20 мкл** каждого **Стандарта, Контроля и образцов новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки.
- Внести **100 мкл свежего разбавленного Ферментного Конъюгата** в каждую лунку. Тщательно перемешать на протяжении 10 секунд.
- Инкубировать **120 минут** при комнатной температуре.
- Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **5 раз** разведенным **Промывочным раствором (400 мкл)**. Ударить лунками резко по салфетке, чтобы удалить оставшиеся капли.
Важное примечание: Чувствительность и точность этого анализа зависят от правильного исполнения процедуры промывания!
- Добавить **100 мкл Раствора субстрата** в каждую лунку.
- Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
- Остановить ферментативную реакцию добавлением **100 мкл Стоп раствора** в каждую лунку.
- Считать оптическую плотность при **450±10 нм** при помощи микропланшетного считывателя **в течение 10 минут** после добавления **Стоп раствора**.

6.3 Подсчет результатов

- Подсчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациентов.
- Построить стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта, против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрацией на горизонтальной (X) оси.
- Используя среднее значение абсорбции для каждого образца определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
- Автоматический метод: Результаты в IFU были рассчитаны автоматически с помощью 4 PL (4-параметровая логистика) кривой. Другие методы обработки данных могут давать несколько отличающиеся результаты.
- Концентрация образцов может быть считана непосредственно со стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем самый высокий Стандарт, должны быть дополнительно разбавлены или заявлены как > 100 Ед/мл. Для вычисления концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Пример типичной Стандартной Кривой

Следующие данные приведены только в качестве примера, и не могут быть использованы вместо полученных во время анализа результатов.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Стандарт 0 (0 мкг/мл)	0.08
Стандарт 1 (3 мкг/мл)	0.19
Стандарт 2 (20 мкг/мл)	0.59
Стандарт 3 (50 мкг/мл)	1.16
Стандарт 4 (100 мкг/мл)	2.02

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

В исследовании, проведенном на очевидно здоровых взрослых, используя CA 72-4 ELISA, следующие значения наблюдаются:

Population	Valid N	Median	Mean	5 th -95 th Percentile
Apparently healthy subjects	65	0.72 U/mL	0.86 U/mL	0 – 2.68 U/mL

Только одни результаты не должны быть единственной причиной для каких-либо терапевтических заключений. Результаты должны быть соотнесены с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли как нормальных, так и патологических уровней.

Контроли и соответствующие результаты QC-лаборатории указаны в сертификате контроля качества, вложенном в набор. Значения и диапазоны, указанные в листе QC всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Кроме того, рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.

Применяйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не сходятся с установленными приемлемыми диапазонами контрольных материалов, результат пациента считается недействительным.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические направления: приборы для пипетирования; фотометр, сроки годности реагентов, условия его хранения и инкубации, методы аспирации и промывки.

После проверки указанных выше пунктов, не найдя никакой ошибки обратитесь к своему дистрибьютору или производителю напрямую.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0.79 - 100 Ед/мл.

9.2 Специфичность антител (Перекрестная реактивность)

Перекрестная реактивность не была обнаружена с соответствующими протеинами.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность рассчитывалась из среднего значения плюс два стандартных отклонения из двадцати (20) повторных анализов 0 Стандарта, и составила 0.79 Ед/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Вариации внутри анализа

Вариативность внутри анализа приведена в таблице ниже:

Образец	n	Среднее (Ед/мл)	CV (%)
1	20	1.4	2.2
2	20	1.6	1.6
3	20	1.6	2.4

9.4.2 Вариации между анализами

Вариативность между анализами приведена в таблице ниже:

Образец	n	Среднее (Ед/мл)	CV (%)
1	40	10.1	4.4
2	40	18.9	4.8
3	40	29.6	4.2

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением растворов CA 72-4 с известными концентрациями в соотношении 1:1.

Восстановление в % было рассчитано путем умножения коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Таблицу см. в оригинале инструкции.

9.6 Линейность

Таблицу см. в оригинале инструкции.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены при проведении анализа с полным пониманием инструкции и с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого теста могут повлиять на результаты.

10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), Билирубин (до 0.5 мг/мл) и Триглицериды (до 7.5 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

На сегодняшний день не выявлено лекарств, которые влияют на измерение CA 72-4.

10.3 Хук-эффект высокой дозы

Хук-эффект высокой дозы не наблюдался в этом тесте до 6.400 Ед/мл CA 72-4.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться точно в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правил GLP (Good Laboratory Practice) или других применимых национальных стандартов и/или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Всегда важно включать, в пределах процедуры испытания, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты испытаний действительны, только, если все Контроли находятся в пределах указанных диапазонов и, если все другие параметры испытания также в пределах, указанных в спецификации анализа. В случае каких-либо сомнений или беспокойства обращайтесь к изготовителю.

11.2 Терапевтические последствия

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если все результаты испытаний находятся в соответствии с пунктами как указано в 11.1. Любой лабораторный результат лишь часть от общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований находятся в приемлемом согласии с общей клинической картиной пациента, можно делать терапевтические заключения.

Сам результат теста не должен быть единственным фактором, являющимся определяющим для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение в тестовом наборе и/или обмен или перемешивание любых компонентов из разных партий одного теста набора на другой может негативно повлиять на предполагаемые результаты и достоверность теста в целом. Такая модификация и/или обмен аннулируют претензии на замену.

Претензии, предъявленные в связи с клиентской неправильной интерпретацией результатов лабораторных исследований, также недействительны. Несмотря на это, в случае любых претензий, ответственность производителя не должна превышать стоимость тестового набора. Любой ущерб, причиненный тестовому набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.



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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»