

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОГО МАРКЕРА ШЛУНКОВО- КИШКОВОГО ТРАКТУ (CA19-9)

120-10, CanAg CA19-9 EIA

Каталог. №: 120-10

Методика від 03-2014

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics, Inc.,
(Швеція)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадат.

ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg CA19-9 EIA призначений для кількісного визначення асоційованого з раком антигена CA19-9 в сироватці крові людини.

ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій техніці "сендвіч". Калібратори, контролю та сироватки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-CA19-9 моноклональними антитілами і моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (HRP) в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. Після промивання в кожну лунку додається буферний реагент субстрат/хромоген (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції в присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену CA19-9, присутньому у зразку. Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що необов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація CA19-9 в зразках пацієнта розраховується з калібрувальної кривої.

РЕАГЕНТИ

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °C. Не заморозуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. Негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °C) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
-----------	-----------	--

Мікропланшет	1 планшет	2-8 °C до закінчення терміну придатності
--------------	-----------	--

12x8 мікролунок, покритих стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатайте пакет, зберігайте сухим.

Калібратори CA19-9	1 флакон x 8 мл, 5 флаконів x 0.75 мл, 0-15-30-60-120-240	2-8 °C до закінчення терміну придатності
--------------------	---	--

Антиген CA19-9 в Трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, інертний жовтий барвник і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання. Калібратор 0 використовувати для розведення зразків.

Контролі CA19-9	2 флакона x 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності
-----------------	---------------------	--

Антиген CA19-9 в Трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін і 0,05% Азид натрію як консервант. Готовий до використання.

Біотин Анти-CA19-9	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------	------------------	--

Біотин Анти-CA19-9 моноклональне мишаче антитіло, ~ 2 мкг/мл. Містить фосфатний цитрат-буфер (pH 7.5), бичачий сироватковий альбумін, блокуючі агенти, Tween 40, інертний червоний барвник і 0.01% метил-ізоціазолін (MIT) в якості консерванту. Готовий до використання.

Трейсер, HRP Анти-CA19-9	1 флакон x 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-CA19-9 моноклональними мишачими антитілами, ~ 40 мкг/мл. Містить консерванти. Повинен бути перед використанням розведений з Розчинником Трейсера.

Розчинник Трейсера	1 x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------	-----------	--

Фосфатний цитрат-буфер (pH 7.5), бичачий сироватковий альбумін, блокуючі агенти, Tween 40, інертний синій барвник і 0.01% метил-ізоціазолін (MIT) в якості консерванту. Готовий до використання.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон x 12 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Сток-розчин	1 флакон x 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	------------------	--

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивального буфера	1 флакон x 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить ТРИС-НСІ сольовий розчин з ТВІН 20 і Germall II як консервант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

Ознаки нестабільності

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для використання в in-Vitro діагностиці

- Тільки для професійного використання
- Будь ласка, зверніться до публікації Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США (Bethesda, штат Меріленд, США) публікація № (CDC) 88-8395 щодо лабораторної безпеки або будь-якого іншого місцевого або національного регулювання.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Уникати контакту з реагентами, що містять перекис водню або соляну кислоту. У разі контакту з будь-яким з цих реагентів, ретельно промийте водою.
- Реагенти містять азид натрію (NaN₃) як консервант. Азид натрію може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні змити з великою кількістю води, щоб запобігти азидного нарощування.
- Дотримуйтесь місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

Увага

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

CanAg CA19-9 EIA призначений для використання з сироваткою. Проведіть забір крові з вени і відокремте сироватку відповідно до звичайних процедур. Зразки можуть зберігатися при температурі 2-8 °C протягом 24 годин. Для більш довгих періодів зберігати при -70 °C або нижче. Трубки, що містять гель, не повинні використовуватися

для довгострокового зберігання. Зразки не повинні зберігатися в холодильній камері, яка сама розморожується. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі 2-8 °С протягом ночі, а потім привести зразки до кімнатної температури перед аналізом.

ПРОЦЕДУРА

Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

1. Мікропланшетний шейкер

Струшування має бути від середнього до сильного, приблизно 700-1100/хвилину.

2. Пристрій для промивання мікропланшета

Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1, 3 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати Nunc Імуно-8 вошер.

3. Мікропланшетний Рідер

З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.

4. Точні піпетки

З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мікролітрах.

5. Дистильована або деіонізована вода

Для приготування Промивного Розчину.

Примітки до методики

1. Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору CA19-9 EIA. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.

2. Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °С) перед використанням. Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-28 °С для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'якко, але ретельно перемішані обережним перевертанням флаконів після відтавання.

3. Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.

4. Вимога ефективної і ретельної промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукати нею по фільтрувальному паперу.

- Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо належного очищення та обслуговування і проведіть необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Рекомендується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переповнення* з об'ємом заповнення 800 мкл. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.

5. Субстрат ТМВ-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності ТМВ HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).

6. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином ТМВ-субстрату HRP.

буферного розчину для промивання.

Робочий Розчин Трейсера

3 тижні при 2-8 °С в герметичному контейнері

Приготуйте потрібний об'єм Робочого Розчину Трейсера змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-CA19-9 з 1 мл Розчинника Трейсера на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-CA19-9 (мкл)	Розчинник 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

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Робочого Розчину Трейсера.

Альтернатива: Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-CA19-9 у флакон з Розчинником Трейсера і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Анти-CA19-9 повністю перелитий у флакон з Розчинником Трейсера.

ПРИМІТКА: Робочий Розчин Трейсера стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °С. Не готуйте більше Робочого Розчину Трейсера, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі калібратори і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °С).

1. Приготуйте Промивний Розчин і Робочий Розчин Трейсера. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
2. Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збираєтеся використовувати протягом 30 хвилин.
3. Внесіть 25 мкл CA19-9 Калібраторів (CAL 0, 15, 30, 60, 120, 240), контролей (C1, C2) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. 0	Кал. 120	Невід. 1		
B	Кал. 0	Кал. 120	Невід. 1		
C	Кал. 15	Кал. 240	Невід. 2		
D	Кал. 15	Кал. 240	І т.д.		
E	Кал. 30	C1			
F	Кал. 30	C1			
G	Кал. 60	C2			
H	Кал. 60	C2			

4. Додайте 100 мкл Біотин Анти-CA19-9 в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
5. Інкубуйте пластину протягом 2 годин (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °С) з постійним потрушуванням.
6. Після першої інкубації видаліть рідину і промийте кожну смужку 3 рази, використовуючи процедуру промивання, описану в п.4.
7. Додайте 100 мкл Робочого розчину Трейсера в кожну лунку. Використовуйте ту ж техніку піпетування як і в пункті 4 вище.
8. Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °С) з постійним потрушуванням.
9. Після другої інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів, використовуючи процедуру промивання, описану в пункті 4.
10. Додайте 100 мкл субстрату ТМБ в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунки не перевищував 5 хвилин.
11. Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
12. Негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °С в герметичному контейнері

Налийте 50 мл промивного концентрату в чисту посудину і розбавте в 25 разів додаванням 1200 мл дистильованої або деіонізованої води для отримання

Альтернативний варіант

Якщо в лабораторії немає рідера з фільтром на 620 нм, оптична щільність може бути визначена як описано нижче:

Альт. 12. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожен лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

Діапазон вимірювання

Набір СА19-9 ЕІА вимірює концентрації між 1 і 240 Од/мл. Якщо концентрація СА19-9 вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з Калібратором 0 перед аналізом.

Контроль якості

Контролі СА19-9 1 і 2 можуть бути використані для перевірки серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо значення виходять за межі зазначених діапазонів, необхідно провести повну перевірку реагентів і продуктивності зчитувача і повторити аналіз. Кожна лабораторія може додатково підготувати свої власні пули сироватки на різних рівнях, які можна використати в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

Референсний матеріал

Оскільки не існує референс-матеріалів для антигену СА19-9, Стандарти прокалібровані проти внутрішнього референс-стандарту.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з СА19-9 калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів СА19-9 рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.
- Метод згладженої кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 слід використовувати як бланк.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.

ПРИМІТКА: 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися.

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (А), отриманих для кожного СА19-9 калібратора проти відповідної концентрації СА19-9 (в Од/мл). Невідомі концентрації СА19-9 потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Якщо зразки в первинному аналізі дають рівні СА19-9 вище, ніж 240 Од/мл, зразки необхідно розвести 1/10 і 1/100 з Калібратором 0 щоб отримати точну концентрацію СА19-9.

1:10 розбавлення = 50 мкл зразка + 450 мкл Калібратора 0

1:100 розбавлення = 50 мкл розведеного 1:10 + 450 мкл Калібратора 0

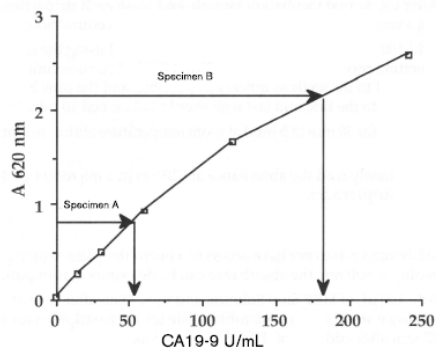
Концентрація СА19-9 в нерозбавлених зразках розраховується наступним чином:

Розбавлення 1/10: 10 x Виміряне значення

Розбавлення 1/100: 100 x Виміряне значення

Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (Од/мл)	Середнє абс. значення (А)	СА19-9 Од/мл
Калібратор 0	0	0.036	
Калібратор 15	15	0.276	
Калібратор 30	30	0.508	
Калібратор 60	60	0.928	
Калібратор 120	120	1.665	
Калібратор 240	240	2.583	
Зразок А		0.815	52
Зразок В		2.130	181



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні СА19-9 не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір СА19-9 не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і СА19-9-тест не повинен заміщати інші клінічні дослідження.

Доброякісні стани, такі як гострий або хронічний панкреатит або cholelithiasis, можуть викликати підвищені рівні СА19-9. Пацієнти з фенотипом Le^{a/b-} не виражають СА19-9 реактивний епітоп. Антитіла анти-реагенту (людське антитіло анти-миші (НАМА) або гетерофільні антитіла) у зразку пацієнта можуть іноді заважати аналізу, навіть якщо специфічні блокуючі агенти включені в буфері.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

СА19-9 був виміряний у 100 здорових донорів крові, 36 жінок і 64 чоловіків. Середнє отримане значення становить 6.5 Од/мл при стандартному відхиленні 6.4. Медіанне значення було 4.5 Од/мл, діапазон 0-29 Од/мл. Нижня і верхня межі нормального діапазону були вивчені за допомогою методів, рекомендованих IFCC. Референсний інтервал містить центральну 95% частку від еталонного розподілу. Референтні межі можуть бути, відповідно, оцінені як 2.5% (нижня) і 97.5% (верхня) фракції. Непараметричні оцінки: N = 100

Фракція	Референсна межа (Од/мл)
2.5-й (нижня)	0
97.5-й (верхня)	25

100% здорових суб'єктів мали значення нижче 37 Од/мл. Рекомендується кожній лабораторії встановити свій власний діапазон нормальних значень з урахуванням локальних факторів навколишнього середовища, таких, як харчування, клімат, умови життя, відбір пацієнтів і т.д.

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського СА19-9. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль. Аналіз проводився 53 місяців не менш ніж трьома лабораторіями і з використанням 20 різних наборів CanAg СА19-9 Точність показана в таблиці:

Зразок	N	Середня конц. Од/мл	В аналізі SD, Од/мл	В аналізі CV, %	Між днями SD, Од/мл	Між днями CV, %
СА19-9 1	80	15.4	0.6	3.8	1.0	6.8
СА19-9 2	80	56.3	1.9	3.3	3.6	6.3
СА19-9 3	80	99.8	4.5	4.5	6.2	6.2
СА19-9 4	80	182	7.9	4.4	12	7.0

Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору складала 1 Од/мл і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора 0}}{\text{OD Калібратора 15} - \text{OD Калібратора 0}} \times 15 \text{ Од/мл}$$

Відновлення

Насичені зразки сироватки були приготовлені додаванням аліквоти зразка з сильно підвищеним значенням СА19-9 до нормального зразка сироватки. % відновлення антигену був знайдений в діапазоні 90-110%.

Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 50000 Од/мл. **ЗАУВАЖЕННЯ:** в зразках з дуже високою концентрацією колір субстрату змінюється з блакитного на зеленуватий (і навіть жовтий при дуже високих концентраціях). Це призводить до хибно низької оптичної щільності при 620 нм і в екстремальних випадках оптична щільність може падати в межах стандартної кривої, що може бути розцінено як Хук-ефект.

Лінійність

8 зразків пацієнтів були розбавлені Калібратором 0 і проаналізовані. Отримані значення склали 96-105% від очікуваних значень в діапазоні 10-200 Од/мл.

Специфічність

	Концентрації с незначною інтерференцією ($\pm 10\%$)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	5 мг/мл

ГАРАНТІЯ

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних, припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії товарного стану та придатності для використання.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com