

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СА-125 - РАКОВОГО АНТИГЕНА 125 МЕТОДОМ ІФА

CA-125 Test System

Кат. №: 3025-300A

Дата випуску інструкції: 08-10-2021
Версія: 5



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

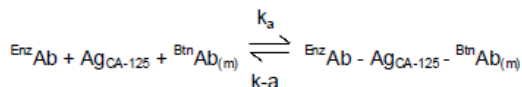
Призначення: Кількісне визначення концентрації ракового антигена 125 (CA-125) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, **в надлишку**, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в лунках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до CA-125. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген CA-125, між CA-125 антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{CA-125}}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

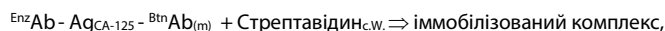
EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{CA-125}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{с.в.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигена. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигена будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори CA-125 - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсів Антигена CA-125 з концентраціями 0 (A), 15 (B), 50 (C), 100 (D), 200 (E) і 400 (F) О/мл (U/ml). Було додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

Зауваження: Стандарти на основі людської сироватки приготовлені на основі афінно очищеного > 99% препарату CA-125. Препарат був відкалібрований за тестом Centocor CA-125 IRMA.

B. Ферментний реагент CA-125 - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить фермент-мічені антитіла, біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

C. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

Один 96-луноковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить поверхнево-активну речовину в буферному фізіологічному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. «Підготовка реагенту».

F. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. «Підготовка реагенту».

G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Інструкція.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного 96-лунокового планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) і 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторюваних дозувань 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) і 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю вище 1.5%.
3. Мікропланшетні вошери або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з довжинами хвиль 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для мікропланшетів для кроків інкубації.
7. Вакуумний аспіратор для кроків промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Матеріали контролю якості.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Встановлено, що всі продукти, які містять людську сироватку, не реагують на поверхневий антиген гепатиту В, антитіла до ВІЛ 1 і 2 і гепатиту С з реагентами, ліцензованими FDA. Оскільки жоден відомий тест не може забезпечити повну впевненість у відсутності інфекційних агентів, усі продукти на основі людської сироватки слід розглядати як потенційно небезпечні та здатні передавати захворювання. Належні лабораторні процедури поводження з продуктами крові можна знайти в Центрі контролю захворювань/Національному інституті здоров'я, «Біологічна безпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях», 2-е видання, 1988 р., публікація HHS № (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору має здійснюватися відповідно до місцевих нормативних та законодавчих вимог.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів під час збору зразків венепункцією. Для точного порівняння з встановленими нормальними значеннями слід взяти ранковий зразок сироватки натщесерце. Кров слід збирати у просту пробірку для венепункції з червоним верхом без добавок або антикоагулянтів. Дайте крові згорнутися. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку від клітин.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (мг)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити отримання зразка натщесерце.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) максимум до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролю на рівнях у низькому, середньому та підвищеному діапазонах кривої дози-відповіді для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі, а значення визначати в кожній проведеній процедурі тестування. Для відстеження ефективності наданих реагентів слід підтримувати карти контролю якості. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про непомічену зміну умов експерименту або погіршення якості реагентів набору. Щоб визначити причину відхилень, слід використовувати свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розведіть вміст флакону з промивним розчином до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте розведений буфер при 2-30 °C (°C) протягом 60 днів.

2. Розчин Робочого субстрату - Стабільний протягом одного (1) року. Перелийте вміст бурштинового флакона, позначеного як Розчин «А», у прозорий флакон, позначений як Розчин «В». Помістіть жовту кришку на прозорий флакон для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Зберігайте при 2-8 °C (°C).

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшета для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу в дублях. Поверніть невикористані мікролункові стрипи в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Піпетуйте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (µl)) сироваткового референсного калібратора, контролю або зразка у відповідні лунки.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Ферментного реагенту CA-125 у кожен лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 0.350 мл (ml) (350 мкл (µl)) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів»), декантуйте або аспіруйте. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) стоп-розчину в кожен лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте

реагенти в тому самому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

- Зчитайте абсорбцію в кожній лунці при довжині хвилі 450 нм (nm) (використовуючи референсну довжину хвилі 620-630 нм (nm), щоб мінімізувати недоліки лунки) у пристрої для зчитування мікропланшетів. Результати слід зчитувати протягом тридцяти (30) хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації CA-125 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть на лінійному міліметровому папері значення поглинання для кожного дубліката референсної сироватки проти відповідної концентрації CA-125 у О/мл (U/ml) (не усереднюйте дублікати референсної сироватки перед побудовою графіка).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву через відкладені точки.
- Щоб визначити концентрацію CA-125 для невідомого, знайдіть середнє значення поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і прочитайте концентрацію (в О/мл (U/ml)) по горизонтальній осі графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання (0.331) перетинає криву доза-відповідь при концентрації CA-125 29.3 О/мл (U/ml) (див. рис. 1).

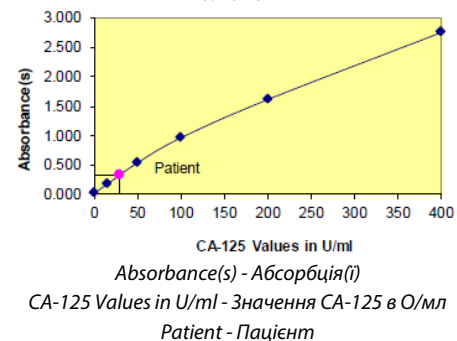
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для обробки даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо використовується таке програмне забезпечення, слід провести перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (О/мл (U/ml))
Калібратор А	A1	0.035	0.029	0
	B1	0.022		
Калібратор В	C1	0.186	0.182	15
	D1	0.178		
Калібратор С	E1	0.536	0.545	50
	F1	0.554		
Калібратор D	G1	0.985	0.967	100
	H1	0.949		
Калібратор E	A2	1.615	1.615	200
	B2	1.616		
Калібратор F	C2	2.749	2.753	400
	D2	2.758		
Зразок	A3	0.336	0.331	29.3
	B3	0.325		

*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «F» повинна бути ≥ 1.3 .
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу.
3. Не використовувати високоліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання розчину субстрату ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунки.
7. Нездатність належним чином видалити залишки розчину на етапах промивання аспірацією або декантацією може призвести до погані реплікації та помилкових результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лоту. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнта з концентрацією CA-125 вище 400 О/мл (U/ml) можна розвести (наприклад, 1/10 або вище) нормальною чоловічою сироваткою (CA-125 < 5 О/мл (U/ml)) і провести повторний аналіз. Концентрацію зразка отримують шляхом множення результату на коефіцієнт розведення (10).
10. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind інструкцій можуть давати невірні результати.
11. Необхідно суворо дотримуватися всіх застосованих національних стандартів, правил і законів, включаючи, але не обмежуючись, належними лабораторними процедурами, щоб забезпечити відповідність і належне використання пристрою.
12. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, зчитувачів, вошерів та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви IVD 98/79/ЄС маркованих CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, може бути отриманий за запитом на електронну пошту Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. Самі лише лабораторні результати є лише одним з аспектів визначення догляду за пацієнтом і не повинні бути єдиною основою для терапії, особливо якщо результати суперечать іншим визначенням.
2. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм та відповідати вимогам аналізу.
3. Реагенти для тест-системи були розроблені для максимального усунення інтерференцій; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень (Boscato LM, Stuart MC. "Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays" Clin.Chem. 1988;34:27-33). Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
4. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютерна програма, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. CA-125 має низьку клінічну чутливість і специфічність як онкомаркер. **Само по собі значення CA-125 не є діагностичною величиною і повинно використовуватися разом з іншими клінічними даними.**

13.0 ОЧІКУВАНИЙ ДІАПАЗОН ЗНАЧЕНЬ

Сироваткові рівні CA-125 підвищені у 1% нормальних здорових жінок, у 3% жінок з доброякісними захворюваннями яєчників, у 6% пацієнтів з неонкологічними станами (включаючи, але не обмежуючись вагітністю в 1 триместрі, менструацією, ендометріозом, фіброзом матки, гострим сальпінгітом, захворюваннями печінки і перитонітом або перикардитом).

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи CA-125 AccuBind® ІФА

Здорові та не вагітні жінки ≤ 35 О/мл (U/ml)

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції «нормальних» людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником лише до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон з використанням методу з корінним населенням місцевості, в якій розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Загальна точність Тест-системи CA-125 AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями була визначена шляхом аналізу на шести різних рівнях пулованого контролю та сироваток пацієнтів. Середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 2.

ТАБЛИЦЯ 2

Дані точності для Тест-системи CA-125

Зразок	Середнє значення (О/мл (U/ml))	Точність в аналізі		Загальна точність (n=80)	
		SD	CV%	SD	CV%
Контроль 1	14.3	0.42	2.94	0.9	6.26
Контроль 2	54.3	1.65	3.05	4.9	9.03
Контроль 3	173.4	6.41	3.69	13.23	7.63
Пацієнт 1	17.6	0.57	3.24	1.72	9.76
Пацієнт 2	85.6	2.86	3.34	6.72	7.84
Пацієнт 3	198.3	7.35	3.71	13.41	6.76

*Вимірювання проводились в 40 експериментах в дублях протягом 20 днів.

14.2 Чутливість

Тест-система CA-125 AccuBind® ІФА має LoB = 0.507 О/мл (U/ml) і LoD = LoQ = 0.785 О/мл (U/ml).

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність Тест-системи CA-125 AccuBind® ІФА була перевірена шляхом розведення зразків сироватки людини, що містять високі рівні CA-125 (133.7-420.5 О/мл (U/ml)), зі зразками сироватки людини з низьким CA-125 (< 2 О/мл (U/ml)). Результати підтверджують, що існує лінійність у різних підготовках зразків у всьому діапазоні тесту до 420.5 О/мл (U/ml).

14.3.2 Відновлення

Відновлення Тест-системи CA-125 AccuBind® ІФА було розраховано для п'яти зразків пацієнтів, насичених різними рівнями CA-125 до 400 О/мл (U/ml). Було визначено, що відновлення знаходиться в межах 20% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.3.3 Порівняння методів

Тест-систему CA-125 AccuBind® ІФА порівнювали з референсним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з низькими, нормальними і підвищеними концентраціями. Загальне число зразків було 121. Було виведено рівняння регресії за методом найменших квадратів і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 3

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод (X)	5.67	$Y = -0.116 + 1.032(x)$	0.998
Метод порівняння (Y)	5.75		

14.4 Специфічність

Для перевірки специфічності використовуваної пари антитіл до відомих сироваткових пулів додавались масивні концентрації можливих перехресних реагентів та аналізувались паралельно з базовими сироватками. Крім того, деякі широко використовувані безрецептурні препарати та деякі цитотоксичні препарати (у 10 разів більше нормальної дози) були випробувані в аналізі. Перехресної реакції не виявлено. Відсоток

відновлення для деяких із цих додатків наведено нижче в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Аналіт	Доданий об'єм	% Відновлення
Білірубін	1 мМоль/л (mMol/L)	98-103
Гемоглобін	1 мМоль/л (mMol/L)	100-106
Тригліцериди	10 мМоль/л (mMol/L)	96-110
РФ	1000 кМО/л (kIU/L)	97-107
Біотин	25 мкг/л (µg/L)	99-103

14.5 Хук-ефект високої дози

Хук-ефект високої дози СА-125 AccuBind® ІФА оцінювали за допомогою кількох зразків, що містять великі концентрації СА-125 (> 10 000 О/мл (U/ml)). Тест не показав хук-ефекту до концентрацій 50000 О/мл (U/ml).



ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i> 100 North Pointe Dr. Lake Forest, CA 92630 - USA Phone: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i> 100 Норд Поінт Драйв Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США Тел.: 949.951.2665 Факс: 949.951.3539 www.monobind.com
---	---



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

