

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СА 15-3 - РАКОВОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ІФА

CA 15-3 Test System

Кат. №: 5625-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 4



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цільове використання: Кількісне визначення концентрації ракового антигена (СА 15-3) у сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

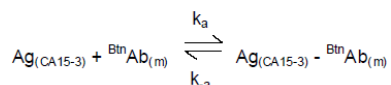
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (тип 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіє сорбований в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до СА 15-3.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген СА 15-3, між СА 15-3 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)

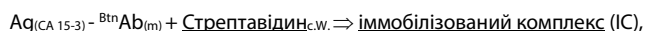
$\text{Ag}_{(\text{CA}15-3)}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{Ag}_{(\text{CA}15-3)} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_a = Константа швидкості дисоціації

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



Стрептавідин_{c.w.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

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

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

де $\text{EnzAb}_{(\text{x-CA}15-3)}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$\text{EnzAb}_{(\text{x-CA}15-3)} - \text{IC}$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_b = константа швидкості дисоціації

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори СА 15-3 - 1.0 мл (мл)/флакон

Шість (6) флаконів з референсними калібраторами на сироватці крові в концентраціях 0 (A), 10 (B), 40 (C), 100 (D), 200 (E) і 400 (F) О/мл (U/ml). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Додано консервант.

Примітка 1: Калібратори постачаються попередньо розведеними.

Примітка 2: Калібратори на основі сироватки людини виготовлялися за допомогою очищеного препарату СА 15-3. Препарат був відкалібрований по тесту Centocor СА 15-3 IRMA.

B. Біотинний реагент СА 15-3 - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон містить біотинильований анти-людський СА15-3 mIgG у матриці, стабілізований білком. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Ферментний реагент СА 15-3 - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон містить пероксидазу хрому з включеною анти-СА15-3 mIgG в матрицю, стабілізовану білком. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1 мкг/мл (µg/ml) Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-30 °C (°C).

F. Матриця для розведення СА 15-3 - 50 мл (мл)

Один флакон розчинника сироватки, що містить буферні солі, білок, ПАР. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Розчин субстрату - 12 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (0.5M (M) H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C (°C).

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

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

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл (µl) з точністю вищою 1.5%.
2. Диспенсери для повторного внесення на 100 і 350 мкл (µl) з точністю не гіршою 1.5%.
3. Дозатори (1000 мкл (µl)) для розведення сироватки.
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском.
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для кроків промивання.
9. Таймер.
10. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або,

наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація комплектуючих набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать кров; сироватка або гепаринізована плазма. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для належного порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

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 пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) 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 повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях потрібно 0.050 мл (ml) сироватки.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями низьким, нормальним і високим для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл (ml). Розбавте до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

2. Розведення зразків пацієнтів (1:21)

Внесіть 25 мкл (µl) кожного контролю та/або зразка пацієнта в 500 мкл (µl) CA 15-3 матриці для розведення, в відповідно помічені чисті контейнери і ретельно перемішайте перед використанням. Зберігайте при 2-8 °C (°C) до 48 годин.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

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

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл (µl) біотинильованого міченого антитіла в кожен лунку. Дуже важливо додавати реагенти близько до дна лунок.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
5. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
7. Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. 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.
8. Додайте по 100 мкл (µl) Ферментного реагенту CA15-3 у кожен лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО РЕАГЕНТУ

9. Накрийте і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
10. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
11. Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. 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.
12. Додайте по 100 мкл (µl) 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

13. Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
14. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
15. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації CA15-3 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

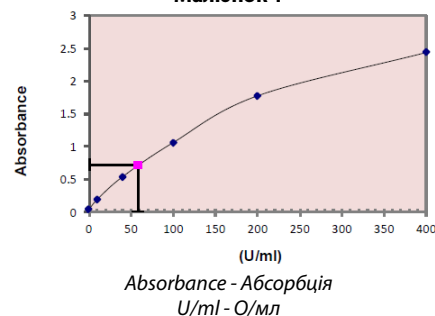
1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх осередків як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації CA15-3 в О/мл (U/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте невідомі концентрації CA15-3 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (0.721) перетинає стандартну криву при 58.4 О/мл (U/ml) (див. мал.1).

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (О/мл (U/ml))
Калібратор А	A1	0.044	0.043	0
	B1	0.042		
Калібратор В	C1	0.204	0.198	10
	D1	0.191		
Калібратор С	E1	0.560	0.543	40
	F1	0.525		
Калібратор D	G1	1.103	1.064	100
	H1	1.024		
Калібратор E	A2	1.784	1.777	200
	B2	1.770		
Калібратор F	C2	2.431	2.438	400
	D2	2.445		
Пацієнт 1	A3	0.737	0.721	58.4
	B3	0.705		

* Дані наведені в прикладі 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:

1. Оптична щільність калібратора F має бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

12.1 Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для устаткування відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентраціями СА 15-3 вище 400 О/мл (U/ml) можна розводити (1:10) з нульовим Калібратором і аналізувати повторно. Отриманий результат помножити на коефіцієнт розведення.
10. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків - як того вимагає Директива 98/79/ЄС з маркування CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна отримати, надіславши запит електронною поштою на адресу Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії, і, як відомо, вони є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів», Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічними обстеженнями, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. 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.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. **СА 15-3 має низьку клінічну чутливість і специфічність як онкомаркер. Клінічно підвищені рівні СА 15-3 самі по собі не є діагностично значущими, а повинні використовуватися тільки в поєднанні з клінічними проявами і діагностичними параметрами.**

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Сироваткові рівні СА 15-3 підвищені у 2% нормальних здорових жінок, у 7% жінок з неонкологічними станами, а також підвищені у випадках раку печінки, легень, яєчника, і при колоректальному раку. Для цих кондицій не встановлені конкретні діапазони.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення СА 15-3 (в О/мл (U/ml))
Здорові жінки ≤ 37 О/мл (U/ml)

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної 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 встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору СА 15-3 всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (О/мл (U/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	20.9	1.91	9.1
Рівень 2	20	61.7	2.03	3.3
Рівень 3	20	96.9	2.67	2.8

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами* (О/мл (U/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	22.2	2.0	9.1
Рівень 2	10	58.5	3.85	6.6
Рівень 3	10	104.6	9.33	8.9

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях протягом семи днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу склала 0.2 О/мл (U/ml) при 3 CO від нульового калібратора. Функціональна чутливість (20% CV) склала 1.25 О/мл (U/ml).

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним ІФА методом. Використовувалися зразки сироваток різних рівнів концентрацій. Загальне число зразків було 43. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	180.2	$y = -0.219 + 1.008x$	0.999
Референсний	178.6	(x)	

14.4 Специфічність

Для оцінки специфічності антитіл використовувалися масивні концентрації можливих перехресно-реагуючих речовин при додаванні до відомих сироваткових пулів і досліджені паралельно з базовою сироваткою. Не знайдено перехресної реактивності. Дані наведені в таблиці нижче:

Аналіт	Концентрація	% Перехр. реактивності
СА 15-3	-	1.000
СА 125	10000 О/мл (U/ml)	0.001
СА 19-9	5000 О/мл (U/ml)	0.001
ПСА	1000 нг/мл (ng/ml)	0.026
АФП	30000 нг/мл (ng/ml)	-
РЕА	5000 нг/мл (ng/ml)	-
ХГЛ	125000 МО/мл (mIU/ml)	-
РФ	12500 МО/мл (IU/ml)	0.001
Білірубін	200 мкг/мл ($\mu\text{g/ml}$)	-
Гемоліз	30 мкл/мл ($\mu\text{l/ml}$)	-

Ліпіди	50 мкг/мл (µg/ml)	-0.009
--------	-------------------	--------



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поїнт 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

