



Набор ИФА для количественного определения CA 72-4 в сыворотке и плазме

Кат. Номер : EIA-3942
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 12-2009

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

Набор DRG CA 72-4 Enzyme Immunoassay Kit является иммуноферментным анализом для количественного диагностического определения *in vitro* CA 72-4 (TAG-72) в сыворотке и плазме.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG CA 72-4 ELISA представляет собой твердо-фазный метод обнаружения специфических антител или антигенов с помощью иммобилизованного на антигене или антителе фермента (ELISA), основанный на принципе сэндвича. Микротитровальные лунки покрыты моноклональным антителом, направленным к единственному антигенному фрагменту молекулы CA 72-4.

Аликвота образца пациента, содержащая опасное вещество CA 72-4 инкубируется в лунке с ферментным конъюгатом - анти-CA 72-4 моноклональное антитело, конъюгированное пероксидазой хрена. После инкубации промыть несвязанный конъюгат.

Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации CA 72-4 в образце.

При добавлении раствора субстрата, интенсивность полученного окрашивания пропорциональна концентрации CA 72-4 в образце пациента.

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 M 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. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

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

Лунки покрыты анти-CA 72-4 моноклональным антителом.

2. Стандарт (Стандарт 0-4), 5 флаконов, 1 мл, готовый к использованию.

0, 3, 20, 50, 100 ед./мл

3. Контроль, 1 флакон (лиофил.), 0.5 мл

см. „Подготовка реагентов“. Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетке флакона или в сертификате качества. Содержит 0,3% Проклина как консерванта.

4. Раствор для разведения образцов, 1 флакон, 3 мл, готовый к использованию.

5. Ферментный конъюгат 10X концентрат, 1 флакон, 1.4 мл,

анти-72-4 антитело конъюгированное к пероксидазе хрена

см. „Подготовка реагентов“

6. Раствор для разведения конъюгата, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию.

7. Раствор субстрата, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию TMB.

8. 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.

9. Промывочный раствор, 1 флакон, 30 мл (40X концентрированный).

см. „Подготовка реагентов“.

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

4.2 Необходимые материалы, не поставляемые с набором

- Микропланшетный калиброванный ридер (450±10 нм).
- Калибровочные микропипетки.
- Промокательная бумага.

- Дистиллированная вода или деионизированная вода.
- Таймер.
- Полулогарифмическая графопостроительная бумага или ПО для обработки данных.

4.3 Условия хранения

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.

4.4 Подготовка реагентов

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

Контроль

Восстановить лиофилизованное содержимое с 0.5 мл. дистиллированной воды и дать отстояться в течение 10 минут. Перед использованием перемешать контроль несколько раз.

Внимание: Восстановленный контроль необходимо распределить и хранить при температуре -20°C.

Промывочный раствор

Добавить деионизированную воду к 40x концентрированному промывочному раствору.

Развести 30 мл концентрированного промывочного раствора с 1170 мл деионизированной воды до получения объема 1200 мл.

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

Ферментный конъюгат

Развести концентрат ферментного конъюгата 1:10 в конъюгате разбавителя.

Стабильность приготовленного ферментного конъюгата: 1 неделя при температуре 2-8°C в герметичной емкости.

Пример:

Если использован весь планшет, развести 1,2 мл ферментного конъюгата 10,8 мл конъюгированного вещества до общего объема 12 мл.

Если же планшет использован не целиком, сразу же подготовить необходимое количество ферментного конъюгата смешав 100 мкл 10X концентрированного ферментного конъюгата с 0.9 мл разбавителя конъюгата на стрип (см. ниже приведенную таблицу):

No. of strips	Enzyme Conjugate 10X conc. (µl)	Enzyme Conjugate Diluent (ml)
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

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

4.6 Повреждение наборов

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. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном исследовании могут использоваться сыворотка или плазма (EDTA-, Heparin- или цитрат плазма).

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре.

Плазма:

Всю кровь необходимо собрать в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт, и сразу же после забора центрифугировать. (Напр. для EDTA плазмы Sarstedt Monovette – красный колпачок - # 02.166.001; для Heparin плазмы Sarstedt Monovette – оранжевый колпачок - # 02.165.001; для Citrat плазмы Sarstedt Monovette – зеленый колпачок - # 02.167.001.)

5.2 Хранение и подготовка образцов

Перед исследованием образцы должны храниться закрытыми в течение 5 дней при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Если в исходном исследовании образец сыворотки содержит стандарт, превышающий самое высокое значение, образцы могут быть разведены 10-кратно или 100-кратно с веществом для разведения образцов и повторно исследованы согласно пункту Процедура анализа.

Для подсчета концентраций необходимо учитывать данный фактор разведения.

Например:

a) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотка + 90 мкл Раствор для разведения образцов (тщательно смешать)

b) разведение 1:100: 10 мкл разведение a) 1:10 + 90 мкл Раствор для разведения образцов (тщательно смешать)

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие 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 держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

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

1. Установите необходимое количество микротитровальных лунок в держателе.
2. Раскапать **20 мкл** каждого стандарта, контроля и образцов новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
3. Раскапать **100 мкл свежеразведенного** ферментного конъюгата (см. „Подготовка реагентов“) в каждую лунку.
4. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. Тщательное перемешивание очень важно в данном этапе.
5. Инкубировать в течение **120 минут** при комнатной температуре, не накрывая планшету.
6. Вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки 5 раз разведенным промывочным раствором (400 мкл на каждую лунку). Выстучать остатки капель из лунок на промокательную бумагу.

Важно:

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

7. Добавить **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
8. Инкубировать в течение **30 минут** при комнатной температуре.
9. Остановить реакцию, добавив **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
10. Считать оптическую плотность при **450±10 нм** микропланшетным ридером **в течение 10 минут** после добавления стоп раствора.

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 типичной калибровочной кривой

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 U/ml)	0.05
Standard 1 (3 U/ml)	0.14
Standard 2 (20 U/ml)	0.65
Standard 3 (50 U/ml)	1.25
Standard 4 (100 U/ml)	2.04

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ - НОРМА

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные и нетипичные значения.

Все участвующие в исследовании нормального диапазона были очевидно здоровыми (N = 55).

В пределах 5 и 95% наблюдались значения между 0 и 3,5 Е/мл (Среднее 0,492 Е/мл).

Результаты вполне соответствуют установленным пороговым значениям (cut-offs) (< 4-6 Е/мл).

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: пипетирующие и измеряющие время приборы; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, методы промывки и аспирации.

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

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

8.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа между 0,3 – 100 Е/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Сыворотки здоровых пациентов не вступает в реакцию с DRG CA 72-4 ELISA.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была подсчитана из среднего и двух стандартных отклонений двадцати повторных анализов нулевого стандарта и была определена на уровне < 0,31 Е/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Вариация в анализе

Внутренние вариации данного исследования приведены ниже в таблице:

Sample	n	Mean (U/ml)	CV (%)
1	20	9.48	4.54
2	20	22.14	3.34
3	20	65.31	3.84

9.4.2 Вариация между анализами

Вариации между анализами приведены ниже в таблице:

Sample	Mean (U/ml)	CV (%)
1	9.99	7.81
2	23.65	5.32
3	69.80	6.35

9.5 Восстановление

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

Ожидаемые значения были подсчитаны путем добавления половины значений, определенных для неразведенных образцов и половины значений известных растворов. % Восстановление было подсчитано путем умножения отношения измерений и ожидаемых значений с 100.

Sample	Added Concentration 1:1 (v/v) (U/ml)	Measured Conc. (U/ml)	Expected Conc. (U/ml)	Recovery (%)
1	0.0	13.02	13.02	
	3.0	7.34	8.01	91.6
	20.0	17.48	16.51	105.8
	50.0	31.56	31.51	100.2
	100.0	60.01	56.51	106.2
2	0.0	42.79	42.79	
	3.0	21.79	22.90	95.2
	20.0	27.43	31.40	87.4
	50.0	43.00	46.40	92.7
	100.0	70.34	71.40	98.5
3	0.0	64.72	64.72	
	3.0	29.31	33.86	86.6
	20.0	38.15	42.36	90.1
	50.0	52.14	57.36	90.9
	100.0	75.79	82.36	92.0

9.6 Линейность

Sample	Dilution	Mean Conc. (U/ml)	Recovery (%)
1	None	13.02	
	1:2	6.39	98.2
	1:4	2.83	87.0
	1:8	1.47	90.2
	1:16	0.80	98.2
2	None	42.79	
	1:2	22.64	105.8
	1:4	10.30	96.3
	1:8	4.75	88.8
	1:16	2.58	96.3
3	None	64.72	
	1:2	33.82	104.5
	1:4	18.25	112.8
	1:8	8.32	102.9
	1:16	4.51	111.6

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены при проведении процедуры анализа с полным пониманием инструкций во вкладыше упаковки, следуя принципам квалифицированной лабораторной практики.

Любое неправильное обращение с образцами или изменение этого анализа может повлиять на результаты.

10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), Билирубин (до 0.5 мг/мл) и Триглицерид (до 30 мг/мл) никак не влияют на результаты исследования.

В исследовании содержатся реагенты для сокращения воздействия НАМА или гетерофильных антител. Однако, слишком высокая линейная плотность НАМА или гетерофильных антител может повлиять на результаты исследования.

10.2 Влияние лекарственных аппаратов

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

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

«Хук-эффект» не был обнаружен в данном исследовании с концентрациями CA 72-4 до 6500 Е/мл.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.ua