

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СА-19-9 - РАКОВОГО АНТИГЕНА 19-9 МЕТОДОМ ІФА

CA-19-9 Test System

Кат. №: 3925-300А

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 4



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

Використання за призначенням: Кількісне визначення концентрації ракового антигена 19-9 (CA 19-9) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

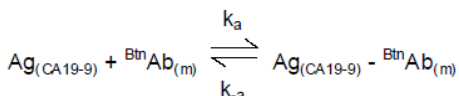
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

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 взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до CA-19-9.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген CA-19-9, між CA-19-9 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:



$B^{tn}Ab_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$Ag_{(CA-19-9)}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$Ag_{(CA-19-9)} - B^{tn}Ab_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

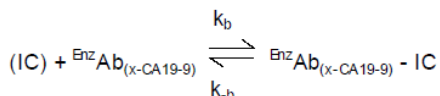
Одночасно в лунках утворюється комплекс завдяки високій афінності реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється нижче:



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

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

Після необхідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антиген-антитіло відокремлюється від не пов'язаних антигенів декантацією або промиванням. Потім додаються інші антитіла (направлені на інший епітоп), мічені ферментом. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків. Відбувається взаємодія мічених ферментом антитіл з комплексом антиген-біотинильовані антитіла на поверхні лунок.



де $\text{Enz}Ab_{(x-CA-19-9)}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$\text{Enz}Ab_{(x-CA-19-9)} - IC$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

Надлишок ферменту видаляється при промиванні. Для розвитку фарбування, вимірюваного за допомогою мікропланшетного спектрофотометра, додають необхідну кількість субстрату. Активність ферменту в лунці прямо пропорційна концентрації нативного вільного антигену у зразку. При використанні декількох різних калібрувальних сироваток з відомими концентраціями антигену, може бути побудована калібрувальна крива, по якій визначають концентрацію антигену в зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори CA-19-9 - 1 мл (мл)/флакон

Шість (6) флаконів еталонних калібраторів на основі сироватки людини з концентраціями 0 (A), 10 (B), 50 (C), 100 (D), 250 (E) і 500 (F) О/мл (U/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

Примітка: Стандарти, засновані на сироватці людини, використовують >99% афінно очищений CA 19-9, стандартизовані по тесту Centocor CA 19-9 IRMA.

B. Біотинний реагент CA-19-9 - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон з реагентом анти-людський CA19-9 (MoAb)-біотин в матриці, стабілізованій білком. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Ферментний реагент CA-19-9 - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон з кон'югатом анти-людський CA19-9-HRP у матриці, стабілізованій білком. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

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

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМВ) в ацетатному буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в ацетатному буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

I. 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 планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl) (μl)) і 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl) (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторюваних дозувань 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl) (μl)) і 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl) (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**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні

результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV 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 компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками має бути сироватка крові; дотримуватися звичайних заходів обережності при збиранні проб венепункцією. Для 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 отримують 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 вимагається 0.050 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні в низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

2. **Робочий Субстратний розчин** - Стабільний протягом одного (1) року. Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C (°C).

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

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають ріст бактерій.

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****

- 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).
- Дозуйте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (μl)) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (μl)) біотинильованого міченого антитіла в кожен лунку. Дуже важливо додавати реагенти близько до дна лунок.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.

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, наповніть кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.

8. Додайте по 100 мкл (μl) Ферментного реагенту СА-19-9 у кожен лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО РЕАГЕНТУ

9. Накрийте і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.

10. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.

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, наповніть кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.

12. Додайте по 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

13. Інкубуйте 15 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 СА-19-9 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

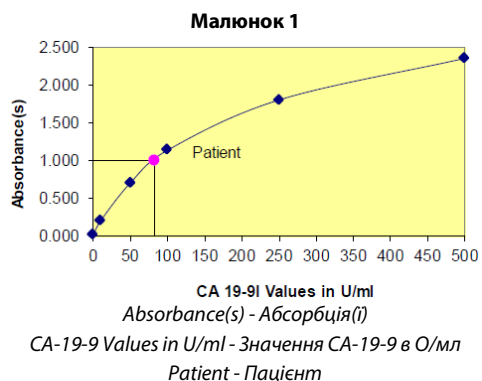
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації СА-19-9 в О/мл (U/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації СА-19-9 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.004 перетинає стандартну криву при 82.9 О/мл (U/ml) (див. мал.1)

Примітка: Програмне забезпечення комп'ютера для обчислення даних, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація
Калібратор А	A1	0.013	0.014	0
	B1	0.014		
Калібратор В	C1	0.210	0.208	10
	D1	0.212		
Калібратор С	E1	0.754	0.708	50
	F1	0.662		
Калібратор D	G1	1.128	1.140	100
	H1	1.152		
Калібратор Е	A2	1.850	1.805	250
	B2	1.760		
Калібратор F	C2	2.310	2.355	500
	D2	2.400		
Зразок	A3	1.009	1.004	82.9
	B3	0.999		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F») ≥ 1.8 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

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 усунення 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 з концентраціями CA-19-9 понад 500 О/мл (U/ml) необхідно розвести (наприклад, 1:10) нульовим калібратором і проаналізувати повторно. Результат помножити на фактор 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 для даного пристрою може бути наданий Monobind.

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, 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 клінічним обстеженням, 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. CA 19-9 має низьку клінічну чутливість і специфічність як онкомаркер. Клінічно підвищені рівні CA 19-9 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 CA 19-9 підвищені в 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 CA 19-9

Здорові та не вагітні жінки ≤ 40 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 CA-19-9 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	3.1	0.22	7.1
Рівень 2	20	28.0	1.42	5.0
Рівень 3	20	161.2	4.21	2.6

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (О/мл (U/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	3.7	0.34	9.2
Рівень 2	10	25.3	1.81	7.1
Рівень 3	10	154.0	5.11	3.4

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Тест-система CA 19-9 AccuBind® ELISA має чутливість 1.0 О/мл (U/ml). Чутливість з'ясували шляхом визначення мінімальності '0' калібратора та використання статистики 2σ (95% визначеності) для обчислення мінімальної дози.

14.3 Точність

Тест-систему CA 19-9 AccuBind® ІФА порівнювали з референсним ІФА методом. Аналізували біологічні зразки низьких, нормальних та підвищених концентрацій. Загальна кількість таких зразків становила 136. Рівняння найменшої квадратної регресії та коефіцієнт кореляції були обчислені для CA 19-9 порівняно з еталонним методом. Отримані дані відображаються в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	18.62	$y = 1.4577 + 0.8837 (x)$	0.955
Референсний	19.43		

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 19-9	-	100
СА 125	1000 О/мл (U/ml)	0.001
СА 15-3	1000 О/мл (U/ml)	-
ПСА	5000 нг/мл (ng/ml)	-
АФП	10000 нг/мл (ng/ml)	-
РЕА	10000 нг/мл (ng/ml)	-
ХГЛ	10000 мМО/мл (mIU/ml)	-
РФ	1000 кМО/мл (kIU/ml)	-



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 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

