Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg CA242 EIA

Кат. № 101-10

IVD

CE

Инструкция по применению. Версия 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg **CA242 EIA**

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

CanAg CA242 EIA предназначен для количественного определения ракового антигена CA242 в сыворотке.

Введение и объяснение метода

Химическая структура ракового маркера CA242, идентифицируемого по C242 моноклональному антителу (MAb), известна неточно, но установлено, что это сиалилированный углеводный антиген. В сыворотке крови CA242 найден на том же самом муциновом комплексе, что и CA50, и сиалированный Льюис антиген (CA19-9). Таким образом, CA242 родственен, но не идентичен эпитопу CA19-9 (1, 2). Уровни CA242 в сыворотке низки у здоровых людей и пациентов с доброкачественными заболеваниями, тогда как повышенные уровни обнаруживаются у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта (3).
Маркер CA242 может быть использован для диагностики и контроля лечения пациентов с известными или подозреваемыми желудочно-кишечными карциномами (4-9). Набор CanAg CA242 EIA не должен замещать любые принятые клинические методы диагностики опухолей, но может использоваться как дополнение к существующим клиническим и лабораторным методам.

Принцип метода

Настоящий набор CanAg CA242 EIA является твердофазным, неконкурентным иммуноферментным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич” технологии. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-CA242 моноклональными антителами (MAb) в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. В процессе инкубации антиген CA242, присутствующий в образцах, сорбируется в покрытых стрептавидином лунках микропланшета биотинилированными анти-CA242 Mab. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена, меченной анти-CA242 Mab C242. После промывки в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментная реакция. В процессе реакции

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена CA242, присутствующему в образце.
Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация CA242 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg CA242 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8ºC.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и использовались, как описано. Немедленно возвращайте оставшиеся реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение

MICROPLA
Микропланшет 1 планшет 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12 стрипов по 8 лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы CA242 5 флаконов, 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

CAL| CA242 | 0 Е/мл	1 x 0.75 мл
CAL| CA242| 15 Е/мл	1 x 0.75 мл
CAL| CA242| 50 Е/мл	1 x 0.75 мл
CAL| CA242| 100 Е/мл	1 x 0.75 мл
CAL| CA242| 150 Е/мл	1 x 0.75 мл

Человеческий антиген CA242 находится в солевом растворе Трис-буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.05% азида натрия в качестве консерванта. Готовы для использования.

Контроли CA242 2 флакона 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

CONTROL| CA242| 1	1x0.75 мл
CONTROL| CA242| 1	1x0.75 мл

Человеческий антиген CA242 содержится в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.05% азида натрия в качестве консерванта. Готовы для использования.

BIOTIN\| Anti-CA242 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
Биотинилированные анти-CA242 антитела
Биотинилированные анти-CA242 мышиные моноклональные антитела, ≈ 1,5 мкг/мл.
Содержит Трис-HCl буфер (pH 7.75), бычий сывороточный альбумин, бычий иммуноглобулин, блокирующие агенты, детергент, инертный красный краситель и 0.05% азид натрия в качестве консерванта. Готовы для использования.

CONJ\| Anti-CA242
Трейсер, HRP-анти-CA242 1 x 0.75 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Сток-раствор пероксидазы хрена (HRP) с анти-CA242 моноклональными антителами мыши, ≈ 40 мкг/мл. Содержит консерванты. Перед использованием должен быть смешан с разбавителем трейсера.

DIL\| CONJ
Разбавитель трейсера 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит раствор фосфатно-солевого буфера (pH 7.2), бычий сывороточный альбумин, бычий иммуноглобулин, блокирующие агенты, детергент, инертный голубой краситель и 0.01% метилизотиазолон (MIT) в качестве консерванта. Готовы для использования.

SUBS\| TMB
HRP-Субстрат ТМБ 1 x 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3 ', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

STOP
Стоп-раствор 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит 0,12 М раствор соляной кислоты (HCl). Готов к использованию.

WASHBUF\| 25X
Промывочный раствор 1 x 50 мл 2-8ºC до истечения
Концентрат 25x срока годности, указанного на бутылке
Содержит ТРИС-HCl буферный солевой раствор с Tween 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности
HRP-Субстрат ТМБ должен быть бесцветным или слабо голубоватым. Голубая окраска свидетельствует о том, что реагент контаминирован, и его следует выбросить.

Предупреждения и меры предосторожности
Только для диагностики *in vitro*.
Только для профессионального использования

- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.
- Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Реагенты набора содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он может взаимодействовать со свинцом и медью канализационной системы с образованием взрывчатых азидов металлов. При сливе остатков реагентов смывайте их большим количеством воды для предотвращения образования азидов.
- Следуйте национальным руководствам по утилизации материалов.

Предосторожности

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

Сбор и подготовка образцов

Набор CanAg CA242 EIA разработан для использования сыворотки. Соберите кровь из вены методом венепункции, отделите сыворотку с помощью обычных процедур.

Образцы могут храниться при 2-8ºC в течение 24 часов. Для более длительного хранения образцов рекомендуется -20ºC или более низкая температуре. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. **Шейкер для микропланшетов**
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, примерно 700-1100 колебаний/мин.
2. **Микропланшетный вошер**
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1, 3 или 6 циклов промывки с минимальным объемом 350 мкл/лунку/цикл промывки.
   Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл..
3. **Микропланшетный спектрофотометр**
   Ридер с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания от 0 до 3.0.
4. **Высокоточные пипетки**
   и одноразовые пластиковые наконечники для дозирования микрообъемов жидкостей, 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл желательна, но не обязательна.
5. **Дистиллированная или деионизированная вода**. для приготовления промывочного буфера

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору CanAg CA242 EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-28ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-28ºC. Замороженные образцы необходимо оттаивать медленно и после оттаивания осторожно и тщательно перемешать.
3. Перед внесением калибраторов, контролей и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Требование эффективной и тщательной промывки для отделения связанного и несвязанного антигена и реагентов от комплексов твердофазное антитело-антиген является одним из наиболее важных этапов при проведении анализа ИФА. Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что все лунки полностью заполнены до верхнего края промывочным раствором во время каждого цикла промывки, этот промывочный раствор вносится с хорошим потоком, а также аспирация лунок между и после циклов промывки завершена и лунки пусты. Если в лунках осталась часть жидкости, переверните планшет на фильтровальную бумагу и легко постучите по рамке планшета.
   Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора по тщательной очистке и уходу и промывайте с необходимым количеством циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендуется использовать режим промывки стрип и режим промывки с переливом при объеме дозирования 800 мкл. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться, что приведет к плохому дозированию и аспирации жидкости..
5. HPR-субстрат TMB очень чувствителен к контаминации. Для оптимальной стабильности HPR-субстрата ТМБ убедитесь в том, что вы используете чистый сосуд или предпочтительно одноразовый пластиковый флакон и чистые одноразовые пластиковые наконечники для предотвращения загрязнения реагента. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).
6. Убедитесь, что вы используете только чистые одноразовые наконечники для пипеток и правильную технику пипетирования во время дозирования образцов и реагентов. Чтобы избежать переноса жидкости, не касайтесь наконечником

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пипетки поверхности стрипов и жидкости, для чего держите пипетку немного выше верхнего края лунки. Правильная техника дозирования имеет особое значение при внесении образцов и раствора TMB HPR-субстрата.

Приготовление реагентов.	**Стабильность приготовленного реагента**
Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºC в герметичном контейнере

Налейте 50 мл промывочного концентрата в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Рабочий раствор трейсера 3 недели при 2-8ºC в герметичном контейнере

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера смешиванием 50 мкл трейсера, HRP Anti-CA242 с 1 мл разбавителя трейсера для одного стрипа (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Число стрипов	**Трейсер,** HRP Anti-CA242 **(мкл)**	**Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое раствора трейсера, HRP Anti-CA242 во флакон с разбавителем трейсера и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера, HRP Anti-CA242 перенесен во флакон с разбавителем трейсера.

Замечание: Рабочий раствор трейсера стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºC. Не готовьте его больше, чем требуется на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводите каждое измерение калибраторов, контролей и образцов пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть доведены до комнатной температуры (20-28ºC).

1. Начните с приготовления Промывочного раствора и Рабочего раствора трейсера. Очень важно использовать чистые контейнеры. Тщательно следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество стрипов в держателе. Немедленно верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте 25 мкл калибраторов CA242 (кал 0, 15, 15, 100, 150), контролей (К) и образцов пациентов (О) в лунки согласно следующей схеме:

	1	**2**	**3**	**4**	**5 и т. д.**
A	кал. 0	кал. 150	О 2		
B	кал. 0	кал. 150	О 2		
C	кал. 15	К 1	и т. д.		
D	кал. 15	К 1			
E	кал. 50	К 2			
F	кал. 50	К 2			
G	кал. 100	О 1			
H	кал. 100	О 1			

4. Добавьте 100 мкл раствора Биотин/анти-CA242 в каждую лунку, используя высокоточную пипетку на 100 мкл (или восьмиканальную высокоточную пипетку). Избегайте соприкосновения наконечников пипетки со стрипом или поверхностью жидкости и переноса реагента из лунки в лунку.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 10 минут) при комнатной температуре (20-28ºC) с постоянным шейкированием планшета на микропланшетном шейкере.
6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 раздела «Замечания по процедуре анализа».
7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора трейсера, в той же последовательности и с той же скоростью, как в шаге 4.
8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-28ºC) при постоянном шейкировании.
9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 раздела «Замечания по процедуре анализа».
10. Добавьте 100 мкл HRP-субстрата ТМБ в каждую лунку, в той же последовательности и с той же скоростью, как в п.4. Раствор HRP-субстрата ТМБ следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре при постоянном шейкировании планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
12. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в шаге Alt. 12.

Alt. 12. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

Диапазон измерения данного набора CanAg CA242 EIA составляет от 1 до 150 Е/мл. Если концентрация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CA125 в образце превышает измеряемый диапазон, образец необходимо развести нормальной человеческой сывороткой.
ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотку, используемую для разведения, также необходимо проанализировать вместе с образцом, для определения концентрации эндогенного CA242 (см. «Расчет результатов»).

Контроль качества
Для контроля достоверности анализа используют CA242 Контроль 1 и Контроль 2. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.
Если контрольные результаты не укладываются в указанный диапазон, тщательно проверьте все реагенты и фотометр и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референс-материалы
Так как не существует референс-материалов для антигена CA242, стандарты прокалиброваны против внутреннего референс-стандарта.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора CA242, указанную на флаконах.
Для автоматического расчета результатов CA242 рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 Ед/мл.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (A), полученных для каждого калибратора, против соответствующих концентраций CA242 (в Ед/мл) (см. рисунок ниже). Значения концентраций CA242 в образцах для каждого пациента находятся по калибровочной кривой.

Если образец дает значение CA242 больше 150 Ед/мл, необходимо разбавить его в 10 раз нормальной человеческой сывороткой и проанализировать повторно для получения точной концентрации CA242 в образце.
ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотку, используемую для разведения, также необходимо проанализировать вместе с образцом, для определения концентрации эндогенного CA242.

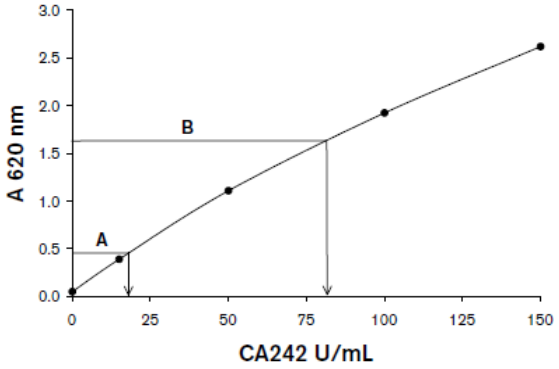
Концентрация CA242 в неразбавленных образцах рассчитывается следующим образом:

Разбавление в 10 раз:

10 x ([Концентрация CA242 разбавленного образца] – (0.9 x [концентрация CA242 в разбавителе образца – нормальной сыворотке])).

Пример результатов

Образец	Значения калибраторов	Средние значения абсорбции (A)	CA242 Ед/мл
Калибратор 0	0 Е/мл	0.05	
Калибратор 15	15 Е/мл	0.390	
Калибратор 50	50 Е/мл	1.107	
Калибратор 100	100 Е/мл	1.922	
Калибратор 150	150 Е/мл	2.617	
Образец A		0.410	16.1
Образец B		1.636	80.9



Пример (не используйте данную кривую для определения результатов реального анализа)

Ограничения метода
Уровни CA242 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор CA242 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты анализа должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний, и CA242-тест не должен заменять другие клинические исследования.
Антитела к реагентам набора (HAMA или гетерофильные антитела) в образце пациента могут интерферировать в этом анализе, несмотря на то, что блокирующие агенты включены в буфер.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (12, 13). В исследовании Grimsey и др. (12) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рекомендуется прекратить прием биотина по крайней мере на 2 дня перед сбором крови для анализа (14).

Ожидаемые значения

Концентрации CA242 были определены этим набором в 184 образцах сывороток здоровых доноров крови (97 женщин и 87 мужчин). Диапазон составил 8,5±7,6 Ед/мл. Нижняя и верхняя границы нормального диапазона оценивались согласно рекомендациям IFCC для непараметрического статистического анализа. Референсный интервал включает 95% фракцию референсного распределения. Референсные пределы, соответственно, могут быть установлены как 2.5% (нижний) и 97.5% (верхний) квантили. Эти пределы отсекают по 2.5% фракции значений от каждого «конца» референсного распределения. Непараметрический метод дал следующие результаты:

Фракция	**Референс-граница (Ед/мл)**	**95% доверительный интервал**
2,5-й (нижний)	0	0-0
97,5-й (верхний)	29	25-44

У 93% здоровых лиц значение было ≤ 20 Ед/мл.

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, подборка пациентов и т. д. Следует также иметь ввиду, что результат базовой линии пациентов обеспечивает наиболее важное рефернсное значение для интерпретации результатов (9).

Характеристики набора

Точность

Общая точность оценивалась согласно NCCLS EP5-A (10). С использованием 4 уровней концентраций пулированной замороженной сыворотки пациентов с гастроинтестинальным раком с добавлением человеческого CA242. Каждый образец был произвольно пипетирован (n=2/анализ) и анализировался дважды каждый день в течение 20 дней подряд. Анализ проводился 42 месяца не менее чем двумя лаборантами и с использованием 20 различных лотов наборов CanAg CA242 EIA.

Обра-зец	Повто-ры	Значе-ние	SD (Е/мл) внутри серии	CV% (Е/мл) внутри серии	SD (Е/мл) между сутками	CV% (Е/мл) между суткам и
1	80	16,2	0,67	4,1	0,39	2,4
2	80	48,4	1,93	4,0	1,82	3,8
3	80	79,5	2,99	3,8	2,46	3,1
4	80	125	5,81	4,7	2,74	2,2

Предел обнаружения

Предел обнаружения для набора CanAg CA242 EIA составил < 1 Ед/мл и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения.

$$\frac{2\text{xSD Калибратора 0}}{\text{OD Калибратора 15} - \text{OD Калибратора 0}} \times 15 \text{ Ед/мл}$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки для оценки извлечения были приготовлены добавлением человеческого антигена CA242 к нормальному образцу сыворотки. % извлечения антигена был найден в диапазоне 87-107%.

Замечание: Исследования извлечения не должны проводиться с использованием набора калибраторов.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 150 000 Ед/мл.

Замечание: в пробах с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый (и даже желтый при очень высоких концентрациях). Это приводит к ложно низкой оптической плотности при 620 нм и в экстремальных случаях оптическая плотность может падать до пределов стандартной кривой, что может быть расценено как Хук-эффект.

Линейность

Образцы пациентов были последовательно разбавлены разбавителем образцов и проанализированы. Полученные значения составили 97-108% от ожидаемых значений.

Специфичность

Набор CanAg CA242 EIA основан на аналитической паре моноклональных антител: захватывающем Mab C241, мишень которого - сиалированный Elisa* антиген, и детектирующем Mab C242, специфичном для эпитопа CA242. В этом анализе определяется S-Le* антиген, содержащий муциновый антиген (ы), экспрессирующий эпитоп CA242. Согласно руководству NCCLS EP7-P (11) были определены возможные источники интерференции. Были проверены следующие вещества и концентрации:

	Концентрация, не оказывающая значительного (± 10%) влияния
Липемия (Intralipid®)	8 мг/мл
Билирубин, неконъюгированный	0.6 мг/мл
гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином

Было проведено исследование для оценки интерференции биотина. В образцы сыворотки с низкой и высокой концентрациями биотина был добавлен биотин до конечных концентраций 15, 30, 60 и 200 нг/мл. Средняя концентрация CA242 была определена для каждого образца и % извлечения для концентрации биотина был рассчитан по формуле:

Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. CA242 с добавкой биотина/ Средняя конц. CA242 с добавкой только разбавителя).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Уровень CA242	Конц. биотина (нг/мл)	Ожидаемая конц. CA242, Ед/мл	Наблюдаемая конц. CA242, Ед/мл	Извлечение, %
низкая	15	16.5	16.3	99
высокая	15	122	121	99
низкая	30	15.3	14.9	97
высокая	30	118	115	98
низкая	60	15.2	13.8	91
высокая	60	117	109	94
низкая	200	16.8	11.1	66
высокая	200	125	86.7	70

На основе линейного регрессионного анализа наименьшая концентрация биотина, влияющая на результаты анализа (≥ 10%) составила 72 нг/мл.

Метод сравнения

Данный набор CanAg CA242 EIA сравнивался с набором CA242 Delfia на 145 образцах сыворотки от здоровых доноров крови и пациентов с онкологическими и доброкачественными заболеваниями в диапазоне 0-250 Ед/мл. Получена следующая линейная регрессия:

CanAg CA242 EIA = 1.02 x CA242 Delfia – 1.1 r=0.99

Гарантии

Характеристики набора, представленные выше, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература:

1. Johansson, C., Nilsson, O., Baeckström, D., Jansson, E.-L. and Lindholm, L. (1991) Novel Epitopes on the CA50-Carrying Antigen: Chemical and Immunochemical Studies, *Tumor Biol.*, 12, 159-179.
2. Johansson, C., Nilsson, O. and Lindholm, L., (1991) Comparison of Serological Expression of Different Epitopes on the CA50-Carrying Antigen CanAg, *Int. J. Cancer,* 48, 757-763.
3. Nilsson, O., Johansson, C., Glimelius, B., Persson B., Nørgaard-Pedersen, B., Andrén-Sandberg, Å., and Lindholm L. (1992): Sensitivity and specificity of CA242 in gastro-intestinal cancer. A comparison with CEA, CA50 and CA19-9. *Br J Cancer 65*, 215-221.
4. Dahlén U., Karlsson B., Lindholm L., Nilsson O., (1993) Development of an enzyme immuno-assay for determination of the tumour associated antigen CA242, *J. Tumor Marker Oncology* 8, 3, p 111.
5. Kawa, S., Tokoo, M., Hasebe, O., Hayashi, K., Imai, H., Oguchi, H., Kiyosawa, K., Furuta, S., and Homma, T.,(1994) Comparative study of CA242 and CA19-9 for the diagnosis of pancreatic cancer, *Br. J. Cancer,* 70, 481-486.
6. Von Kleist, Hesse, Kananeeh, (1996) Comparative Evaluation of Four Tumor Markers, CA 242, CA 19-9, TPA, and CEA in Carcinomas of the Colon, *Anticancer Research* 16: 2325-2332.
7. Spila A, Ferroni P, Cosimelli M, D'Alessandro R, Abbolito MR, Mariotti S, Aloe S, Carone MD, Graziano F, Tedesco M, Martini F, Mancini R, Stigliano V, Roselli M, Guadagni F. (2001) Comparative analysis of CA 242 and CA 19-9 serum tumor markers in colorectal cancer patients. A longitudinal evaluation. *Anticancer Res.* Mar-Apr;21(2B):1263-70.
8. Carpelan-Holmström, M., Haglund, K., Lundin, J., Järvinen, H and Roberts, P., (1996) Pre-operative serum levels of CA 242 and CEA predict outcome in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 32(7), 1156-1161.
9. Engarås B. (2003) Individual cutoff levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 indicate recurrence of colorectal cancer with high sensitivity. *Dis Colon Rectum*. Mar;46(3):313-21.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
12. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
13. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
14. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg CA242 EIA

Кат. № 101-10

Смешивайте компоненты прямо перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/Планшет	Действия
1. Приготовить промывочный раствор	Концентрат промывочного раствора	Разбавить 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной воды
Приготовить рабочий раствор трейсера	Трейсер Разбавитель трейсера	Смешать 50 мкл трейсера, HRP-анти-CA242 с 1 мл разбавителя трейсера на стрип: № стрипа — Трейсер, HRP-анти-CA242. мкл — Разбавитель 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
2. Промывка	Планшет	Промыть каждую лунку один раз промывочным раствором Используйте ручной или автоматический вошер.
3. Добавить калибраторы, контроли и образцы	Калибраторы 0, 15, 50, 100, 150, образцы	25 мкл в каждую лунку
4. Добавить биотинилированные анти-CA242	Биотин анти CA242	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	Планшет	2 часа, встряхивая при комнатной температуре
6. Промывка	Планшет	Промыть каждую лунку 3 раза промывочным раствором Используйте ручной или автоматический вошер.
7. Добавить рабочий раствор трейсера	Трейсер Разбавитель трейсера	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	Планшет	1 час, встряхивая при комнатной температуре
9. Промывка	Планшет	Промыть каждую лунку 6 раз промывочным раствором Используйте ручной или автоматический вошер.
10. Добавление ТМБ HRP-субстрата	Субстрат ТМБ	100 мкл в каждую лунку
11. Инкубация	Планшет	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
12. Считывание оптической плотности	Планшет	620 нм

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

13альт. Добавить стоп-раствор	Стоп-раствор	100 мкл в каждую лунку
14альт. Инкубация	Планшет	1 мин., встряхивая при комнатной температуре
15а. Считывание оптической плотности	Планшет	Считать при 405 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg **CA19-9 EIA**

Кат. N 120-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg **CA19-9**

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение
CanAg CA19-9 предназначен для количественного определения ракового антигена CA19-9 в сыворотке крови человека.

ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

Набор CanAg CA19-9 EIA основан на использовании мышиных моноклональных антител C192, высокоспецифичных для сиалильного эпитопа Льюиса, также известного как антиген CA19-9 (1). У взрослых эпитоп обычно экспрессируется в следовых количествах клетками слизистой оболочки эпителия желудочно-кишечного тракта. У пациентов со злокачественными заболеваниями эпитоп может быть связан с высокомолекулярным муцином в крови. Анализ на CA19-9 часто используется для мониторинга злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта, таких как рак поджелудочной железы, желчного пузыря, желудка и колоректальный рак (2, 3).

ПРИНЦИП МЕТОДА

CanAg CA19-9 EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич” технологии. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными моноклональными антителами к CA19-9 (MAb) C192, полученными из мыши, в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. В процессе инкубации CA19-9, содержащийся в калибраторах или образцах пациентов, сорбируется на покрытых стрептавидином лунках микропланшета с биотинилированными моноклональными антителами к CA19-9. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена, меченной анти- моноклональными антителами C192 к CA19-9. После промывки в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубое окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству антигена CA19-9, присутствующему в образце.
Интенсивность окрашивания измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм (или,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

что необязательно, при 405 нм, после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация CA19-9 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

РЕАГЕНТЫ
Каждый набор CanAg CA19-9 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
Не используйте набор после истечения срока годности.
Не смешивайте реагенты из различных лотов.
Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте.
Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках, а также хранятся и используются, как описано в инструкции. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 микропланшет	2-8ºC До истечения срока годности указанного на микропланшете

12x8 разделяемых лунок микропланшета, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы CA19-9 6 флаконов 2-8ºC
До истечения срока годности, указанного на флаконах

CA19-9 0 Ед/мл	8 мл
CA19-9 15 Ед/мл	0.75 мл
CA19-9 30 Ед/мл	0.75 мл
CA19-9 60 Ед/мл	0.75 мл
CA19-9 120 Ед/мл	0.75 мл
CA19-9 240 Ед/мл	0.75 мл

CA 19-9 антиген в солевом растворе Трис-HCl буфере с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.05% азидом натрия в качестве консерванта. Готовы к использованию. Калибратор 0 должен также использоваться для разведения образцов.

Контроли CA19-9 2 флакона 2-8ºC
До истечения срока годности, указанного на флаконах

CA19-9 контроль 1	0.75 мл
CA19-9 контроль 2	0.75 мл

CA 19-9 антиген находится в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.05% азидом натрия в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Биотин Анти -CA19-9 1 x 15 мл 2-8ºC
До истечения срока годности, указанного на флаконе
Биотин - моноклональные антитела мыши к CA19-9, примерно 2 µг/мл. Содержит фосфатно-цитратный буфер (pH 7,5), бычий сывороточный альбумин, блокирующие агенты, Tween 40, инертный красный краситель и 0,01% метилизотиазолон (MIT) в качестве консерванта. Готов к использованию.

Конъюгат антител к CA19-9
Трейсер, HRP антитела к CA19-9 1 x 0,75 мл 2—8°C
До истечения срока годности, указанного на флаконе
Сток-раствор моноклональных антител к CA19-9, меченных пероксидазой хрена, примерно 40 µг/мл. Содержит консерванты. Перед использованием необходимо разбавить Разбавителем трейсера.

Разбавитель трейсера 1 x 15 мл 2-8ºC
До истечения срока годности, указанного на флаконе
Фосфатно-цитратный буфер (pH 7,5), содержит бычий сывороточный альбумин, блокирующие агенты, Tween 40, инертный синий краситель и 0,01% метилизотиазолон (MIT) в качестве консерванта. Готов к использованию.

HRP-Субстрат ТМБ 1x12 мл 2-8ºC
До истечения срока годности указанного на флаконе
Содержит забуференную перекись водорода и 3, 3 ’, 5, 5’ тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

Стоп-раствор 1 x 15 мл 2-8ºC
До истечения срока годности указанного на флаконе
Готов к использованию. Содержит 0.12 M соляной кислоты.

Промывочный концентрат 1 x 50 мл 2-8ºC
До истечения срока годности указанного на флаконе
Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой. Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с Tween 20 и Germall II в качестве консерванта.

Показатели нестабильности
Раствор HRP-субстрата ТМВ должен быть бесцветным или слабо голубым. Голубое окрашивание указывает на то, что реагент был контаминирован и должен быть утилизирован.

Предупреждения и меры предосторожности
ТОЛЬКО для диагностики *in vitro.*
• Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.
• Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
•Избегайте контакта с реагентами, содержащими перекись водорода или соляную кислоту. В случае контакта с любым из этих реагентов промойте пораженное место тщательно большим количеством воды.
• Реагенты содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Азид натрия может взаимодействовать со свинцом и медью в канализационной системе с образованием взрывчатых азидов металлов. При утилизации смывайте большим количеством воды для предотвращения образования азидов.
•Следуйте региональным руководствам по утилизации отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предосторожности

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Но, так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие инфекционных заболеваний, передающихся с кровью, то со всеми реагентами, приготовленными из материалов человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Набор CanAg CA19-9 EIA предназначен для использования сыворотки. Соберите кровь венепункцией, отделите сыворотку стандартными методами.

Образцы могут храниться при 2-8ºC в течение 24 часов. Для более длительного хранения аликвот образцов рекомендуется температура -70ºC или ниже. Не храните образцы в морозильнике с функцией авторазмораживания. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1, 3 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл..
3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками на 100 мкл рекомендуются, но не обязательны. Пипетки для внесения объемов в миллилитрах.
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору CanAg CA19-9 EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Реагенты перед использованием должны быть доведены до комнатной температуры (20–25°C). Для получения наиболее точных результатов анализ следует выполнять при температуре между 20 и 25ºC. Замороженные образцы должны быть аккуратно, но тщательно перемешаны путем плавного переворачивания после оттаивания.
3. Перед внесением калибраторов и образцов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Требование эффективной и тщательной промывки для отделения связанного и несвязанного антигена и реагентов от комплексов твердофазное антитело-антиген является одним из наиболее важных этапов при проведении анализа ИФА. Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что все лунки полностью заполнены до верхнего края промывочным раствором во время каждого цикла промывки, этот промывочный раствор вносится с хорошим потоком, а также аспирация лунок между и после циклов промывки завершена и лунки пусты. Если в лунках осталась жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и промывайте с необходимым количеством циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендовано использовать режим работы со стрипами и режим промывки с переливом при объеме дозирования 800 мкл. Устройство для аспирации/промывки не следует оставлять на длительное время заполненным промывочным раствором, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому дозированию и аспирации жидкости.
5. Раствор HPR-субстрата TMB очень чувствителен к контаминации. Оптимально для сохранения стабильности HPR-субстрата TMB перенесите необходимое количество реагента из флакона в чистый резервуар или одноразовую пластиковую ванночку, для того чтобы избежать контаминации реагента. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).
6. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику точного дозирования при работе с образцами и реагентами. Чтобы избежать переноса жидкости, не касайтесь наконечником пипетки поверхности стрипов и жидкости, для чего держите пипетку немного выше верхнего края лунки. Правильная техника дозирования имеет особое значение при внесении образцов и раствора TMB HPR-субстрата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºС в герметичном контейнере

Налейте 50 мл концентрата промывочного раствора в чистый контейнер и разведите в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения буферного промывочного раствора.

Рабочий раствор трейсера 3 недели при 2-8ºС в герметичном контейнере

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера, смешав 50 мкл раствора трейсера, HRP Anti-CA19-9 с 1 мл разбавителя трейсера на стрип.

Кол-во стрипов	Раствор трейсера HRP Anti-CA19-9 (мкл)	Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое трейсера, HRP Anti-CA19-9 во флакон с разбавителем трейсера и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера HRP Anti-CA19-9 перенесен во флакон с разбавителем трейсера.

Замечание: Рабочий раствор трейсера стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºС. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Выполняйте каждое определение в дублях как калибраторов, так и образцов пациентов. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Все реагенты и образцы перед использованием должны быть доведены до комнатной температуры (20-25°С).

1. Начните с приготовления промывочного раствора и рабочего раствора трейсера. Важно использовать чистые контейнеры. Тщательно следуйте указаниям в инструкции.
2. Установите необходимое количество стрипов в рамку-держатель. Сразу верните неиспользуемые стрипы в фольгированный пакет с осушителем и тщательно закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Внесите по 25 мкл калибраторов CA19-9 (кал. 0, 5, 25, 100, 250, 500), контролей (к) и образцов пациентов (обр) в лунки микропланшета согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. 0	кал. 120	обр.1		
B	кал. 0	кал. 120	обр. 1.		
C	кал. 15	кал.240	обр.2		
D	кал. 15	кал.240	и т. д.		
E	кал. 30	к. 1			
F	кал. 30	к. 1			
G	кал. 60	к. 2			
H	кал. 60	к. 2			

4. Внесите по 100 мкл раствора биотинилированных антител к CA19-9 в каждую лунку, используя высокоточную пипетку на 100 мкл (или восьмиканальную высокоточную пипетку). Избегайте соприкосновения наконечников пипетки со стрипом или поверхностью жидкости и переноса реагента из лунки в лунку.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 5 минут) при комнатной температуре (20-25ºС) с постоянным перемешиванием микропланшета на шейкере.
6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 ”Замечаний по процедуре анализа”.
7. Внесите в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора трейсера в той же последовательности, как в шаге 4.
8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-25ºС) с постоянным перемешиванием.
9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 “Замечаний по процедуре анализа”.
10. Внесите по 100 мкл HRP-субстрата ТМБ в каждую лунку, в той же последовательности, как в п. 4. Раствор HRP-субстрата ТМБ следует вносить по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
12. Немедленно считайте оптическую плотность на спектрофотометре при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в шаге 12 альт.

12 альт. Внесите 100 мкл стоп-раствора и перемешайте. После этого в течение 15 минут после внесения стоп-раствора считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

Диапазон измерения данного набора CanAg CA19-9 EIA составляет 1-240 Ед/мл.

Если концентрация CA19-9 в образце предполагается выше ожидаемого диапазона измеряемых значений, его перед проведением анализа необходимо развести калибратором 0.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль качества
Для контроля достоверности анализа используют Контроль 1 CA19-9 и Контроль 2 CA19-9. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.
Если результаты в контролях не укладываются в указанный диапазон, тщательно проверьте все реагенты и характеристики ридера и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референс-материалы
Так как не существует референс-материалов для антигена CA19-9, стандарты прокалиброваны по набору внутренних референсных стандартов производителя.

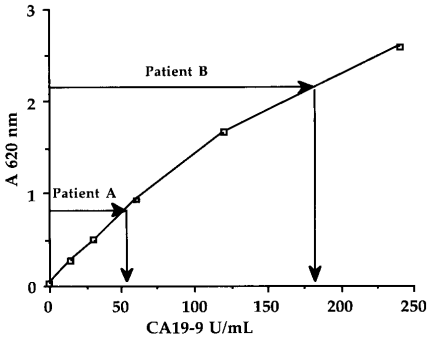
РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру постройте программу, используя концентрацию, указанную на этикетке к каждому калибратору CA19-9.
Для автоматического расчета результатов определения CA19-9 рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 Ед/мл.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк.
- Интерполяция *от точки к точке*. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/л.
- *Квадратичная* регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.
Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (A), полученных для каждого калибратора, против соответствующих значений концентраций CA19-9 (в Ед/мл) (см. рисунок ниже). Значения концентраций CA19-9 в образцах для каждого пациента находятся по калибровочной кривой.
Если в образце уровень CA19-9 выше 240 Ед/мл, для получения точных результатов его необходимо развести в соотношении 1/10 или 1/100 нулевым калибратором.
1:10 разведение = 50 мкл образца + 450 мкл калибратора CA19-9 0.
1:100 разведение = 50 мкл разбавленного 1:10 + 450 мкл калибратора CA19-9 0
Концентрация CA19-9 в неразбавленных образцах рассчитывается следующим образом:
Разведение 1/10: 10 x Измеренное значение
Разведение 1/100: 100 x Измеренное значение

Пример

Образец	Значения калибраторов	Значения поглощения (A)	CA19-9 Ед/мл
Калибратор 0	0 Ед/мл	0.036	
Калибратор 15	15 Ед/мл	0.276	
Калибратор 30	30 Ед/мл	0.508	
Калибратор 60	60 Ед/мл	0.928	
Калибратор 120	120 Ед/мл	1.665	
Калибратор 240	240 Ед/мл	2.583	
Образец A		0.815	52
Образец B		2.130	181



Пример, не используйте данную кривую для определения результатов реального анализа.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА
Уровни CA19-9 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор CA19-9 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты анализа должны интерпретироваться только в совокупности с другими исследованиями и методами диагностики заболевания и контроля пациентов и анализ CA19-9 не должен замещать другие клинические исследования.
Доброкачественные состояния, такие как острый или хронический панкреатит, а также желчнокаменная болезнь, могут приводить к повышению уровней CA19-9. У пациентов с фенотипом Le $^{a-/b-}$ реактивный эпитоп CA19-9 не экспрессируется.
Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), которые могут присутствовать в образцах сывороток пациентов, могут иногда влиять на результаты анализа, несмотря на то, что в буфер добавлены специфические блокирующие агенты.

Биотин может интерферировать в этом анализе, давая ложные низкие результаты.. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотке наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (6, 7). В исследовании Grimsey и др. (6) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (8).

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ
CA19-9 был измерен данным методом у 100 здоровых доноров крови, 36 женщин и 64 мужчин. Среднее значение составило 6,5 Ед/мл со стандартным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

отклонением 6,4. Медиана составила 4,5 с диапазоном 0-29 Ед/мл. Нижняя и верхняя границы нормального диапазона оценивались согласно рекомендациям IFCC для непараметрического статистического анализа. Доверительный интервал содержит центральную 95% фракцию референсного распределения. Соответственно, референсные границы могут быть установлены как 2.5% (нижний) и 97.5% (верхний) квантили. Эти границы отсекают фракцию 2.5% значений каждого конца референсного распределения. Непараметрическая оценка:
N=100

Фракция	**Референс-граница (Ед/мл)**
2,5-й (нижний)	0
97,5-й (верхний)	25

У 100% здоровых лиц значения были ниже 37 Ед/мл. Рекомендовано каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, подборка пациентов и т. д.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Точность

Точность оценивалась согласно NCCLS EP5-A (4) с использованием 4 уровней концентраций пулированной замороженной сыворотки, содержащей добавку пула асцитной жидкости. Каждый образец был произвольно пипетирован (n=2/анализ) и анализировался дважды каждый день в течение 20 дней. Анализ проводился в течение 53 месяцев не менее чем тремя операторами и с использованием 20 различных лотов наборов CanAg CA19-9 EIA

Образец	**Повторы**	**Значение (Ед/мл)**	**SD (Ед/мл) внутри серии**	**CV% (Ед/мл) внутри серии**	**SD (Ед/мл) между сутками**	**CV% (Ед/мл) между сутками**
1	80	15,4	0,6	3,8	1,0	6,8
2	80	56,3	1,9	3,3	3,6	6,3
3	80	99,8	4,5	4,5	6,2	6,2
4	80	182	7,9	4,4	12	7,0

Предел обнаружения

Предел обнаружения для данного набора составил < 1 Ед/мл и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора CA19-9 плюс 2 стандартных отклонения согласно формуле:

$$\frac{2\times SD\ \text{Калибратора 0}}{OD\ \text{Калибратора 15} - OD\ \text{Калибратора 0}} \times 15\ \text{Ед/мл}$$

Извлечение

Разбавленный образцы сыворотки были приготовлены добавлением антигена CA19-9 к нормальным образцам сыворотки. Извлечение антигена было рассчитано в диапазоне 90-110%.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 50 000 Ед/мл.
Замечание: в образцах с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый (и даже желтый при очень высоких концентрациях). Это приводит к ложно низкой оптической плотности при 620 нм и в экстремальных случаях оптическая плотность может падать до пределов стандартной кривой, что может быть расценено как Хук-эффект.

Линейность

Восемь образцов пациентов были последовательно разведены калибратором 0 и проанализированы. Полученные значения были получены в диапазоне 96-105% от ожидаемых значений в диапазоне концентраций 10-200 Ед/мл.

Специфичность

Набор разработан на основе моноклональных антител C192, высоко специфичных для сиалированного Левис[a] эпитопа (1). Возможные источники интерференции были определены согласно руководству NCCLS EP7-P (5). Были проверены следующие вещества и не найдена интерференция с ними:

	Концентрация с незначительной (+10%) интерференцией
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин неконъюгированный	0,6 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 200 нг/мл. Средняя концентрация CA19-9 была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. CA19-9 с добавкой биотина / Средняя конц. CA19-9 с добавкой только разбавителя).

Уровень аналита CA19-9	**Конц. биотина**	**Ожидаемая конц. CA19-9, Ед/мл**	**Наблюдаемая конц. CA19-9, Ед/мл**	**Извлечение, %**
Низкая	15	17.6	17.7	100
Высокая	15	143	144	101
Низкая	30	17.8	17.7	99
Высокая	30	145	146	101
Низкая	60	18.0	17.4	97
Высокая	60	147	145	99
Низкая	200	17.9	9.71	54
Высокая	200	146	90.0	62
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 73 нг/мл.				

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Rye P. D. et al., (1998) Summary report on the ISOBM TD-6 workshop: Analysis of 20 monoclonal antibodies against Sialyl Lewis[a] and related antigens. Montreaux, Switzerland; September 19-24 1997. *Tumor Biol.* 19: 390-420.
2. Eskelinen M., and Haglund U. (1999) Developments in serologic detection of human pancreatic adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 34: 833-844.
3. Hammarström S., and Stigbrand T. (2002) Gastric Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACC Press, Washington pp 375-379.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Preci sion Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
6. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
7. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
8. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg CA19-9 EIA Кат. N 120-10

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Встряхивайте в соответствии с данной инструкцией.

Шаг	Флакон/Микропланшет	Действия
1. Приготовьте промывочный раствор	WASHBUF | 25X	Разведите 50 мл концентрата промывочного раствора в 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды
Приготовьте рабочий раствор трейсера	CONJ | Anti- CA19-9 DIL | CONJ	Смешайте 50 мкл трейсера, **HRP-Anti- CA19-9** с 1 мл Разбавителя трейсера на стрип: **№ стрипа** / **Трейсер HRP-Anti- CA19-9 мкл** / **Разбавитель 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
2. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку один раз промывочным раствором. Используйте ручной или автоматический вошер.
3. Добавьте калибраторы, контроли и образцы	CAL | CA19-9 0, 15, 30, 60, 120, 240 CONTROL | CA19-9 1, 2, образцы	25 мкл в каждую лунку.
4. Добавьте биотинилированные анти-CA19-9 антитела	BIOTIN | Anti-CA-19-9	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	MICROPLA	2 часа, встряхивая при комнатной температуре
6. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку шесть раз промывочным раствором. Используйте ручной или автоматический вошер.
7. Добавьте рабочий раствор трейсера	Рабочий Раствор Трейсера	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре
9. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку шесть раз промывочным раствором. Используйте ручной или автоматический вошер.
10. Добавление ТМБ HRP-субстрата	SUBS | TMB	100 мкл в каждую лунку
11. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
12. Считывание оптической плотности	MICROPLA	620 нм
Альт.12 Добавьте стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую лунку
13а. Инкубация	MICROPLA	1 минуту, встряхивая при комнатной температуре
14а. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считайте при 405 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg CA15-3 EIA

Кат. N 200-10

IVD

CE

Инструкция по применению. Версия 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения


Использовать до



Номер лота


Дата производства



Только для диагностики In Vitro



Номер по каталогу



Температурный режим



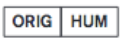
Содержит достаточные количества для «96» определений


Обратитесь к инструкции по применению

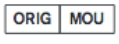


Компоненты набора

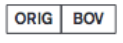

Биологическая опасность



Человеческого происхождения



Мышиного происхождения



Крупного рогатого скота


Растворить в


Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg CA15-3 EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg CA15-3 EIA предназначен для количественного определения ракового антигена MUC-1 (CA15-3)в сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

MUC-1 антиген представляет собой расположенный на мембране гликопротеин муцинового типа, присутствующий в злокачественных и нормальных эпителиальных клетках определенных органов, таких, как молочная железа, легкие, яичники, поджелудочная железа и кишечник (1). Апопротеин MUC-1 содержит трансмембранный домен, цитоплазматический домен и экстрацеллюлярный домен с высоким содержанием углеводов. Экстрацеллюлярный домен характеризуется полиморфизмом, в котором содержится участок из 20 аминокислот (VNTR полиморфизм). Тест-система CanAg CA15-3 EIA основана на использовании двух типов моноклональных антител мыши: Ma695, захватывающих антител, распознающих сиалированный углеводный эпитоп, экспрессирующийся на муцине MUC-1, и антител Ma552 в качестве трейсера, специфических к PDTRPAPG региону коровой части белка (2-5).
Муцин MUC-1 рака молочной железы (антиген CA15-3) секретируется в опухолевых клетках и является хорошо известным маркером для мониторинга больных с диагнозом рак молочной железы (6).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор CanAg CA15-3 EIA основан на твердофазном неконкурентном иммуноферментном методе, с прямой “сэндвич” технологией. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными моноклональными антителами к CA15-3 (MAb) и моноклональными антителами к CA15-3, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP), в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. После промывки в каждую лунку добавляется раствор субстрата/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубое окрашивание. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству антигена CA15-3, присутствующего в образце.
Интенсивность окрашивания измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм, после добавления стоп-раствора). Калибровочную кривую строят для каждого анализа, в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация CA15-3 в образцах пациентов рассчитывается по калибровочной кривой.

РЕАГЕНТЫ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Каждый набор CanAg CA15-3 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
Не используйте набор после истечения срока годности.
Не смешивайте реагенты из различных лотов.
Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте.
Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках, а также используются, как описано в инструкции. После использования немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C).

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 микропланшет	2-8˚C До истечения срока годности указанного на микропланшете

12x8 разделяемых лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы CA15-3	**5** флаконов	2-8˚C до истечения срока годности, указанного на флаконе
CA15-3 0 Ед/мл	0.75 мл	
CA15-3 15 Ед/мл	0.75 мл	
CA15-3 50 Ед/мл	0.75 мл	
CA15-3 125 Ед/мл	0.75 мл	
CA15-3 250 Ед/мл	0.75 мл	

MUC-1 антиген в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% метил-изотиазолоном (МИТ) в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Контроли CA15-3	**2** флакона	2-8˚C До истечения срока годности указанного на флаконах
CA15-3 контроль 1	0.75 мл	
CA15-3 контроль 2	0.75 мл	

MUC-1 антиген находится в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.01% метил-изотиазолоном (МИТ) в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Биотин Анти -CA15-3	1 флакон 15 мл	2-8˚C До истечения срока годности указанного на флаконе

Биотин-моноклональные мышиные антитела к CA15-3, примерно 2,5 мкг/мл. Содержит фосфатно-солевой буфер (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим иммуноглобулином, блокирующими агентами, детергентами, инертным синим красителем и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Перед использованием необходимо смешать с трейсером - конъюгатом антител к CA15-3 с HRP.

Конъюгат антител к CA15-3		
Трейсер, HRP-анти-CA15-3	1 x 0,75 мл	2-8°C До истечения срока годности указанного на флаконе

Сток-раствор мышиных моноклональных антител к CA15-3, меченных пероксидазой хрена, примерно 50 мкг/мл.
Содержит консерванты. Перед использованием необходимо смешать с биотин-анти-CA15-3.

Буфер для разведения образцов	1 x 15 мл	2-8˚C До истечения срока годности указанного на флаконе

Буферный солевой раствор, содержащий Трис-HCl, с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Готов к использованию. Буфер для разведения образцов может быть заказан дополнительно: «буфер для разведения образцов CA15-3 EIA», кат. № 200-24, содержит 50 мл.

Субстрат HRP-ТМБ	1x12 мл	2-8˚C До истечения срока годности указанного на флаконе

Содержит забуференную перекись водорода и 3, 3 ’, 5, 5’ тетра-метилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

Стоп-раствор	1 x 15 мл	2-8˚C До истечения срока годности указанного на флаконе

Содержит 0.12 М соляной кислоты Готов к использованию.

Буфер для промывки, концентрат 25x	1 x 50 мл	2-8˚C До истечения срока годности указанного на флаконе

Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с Twin 20 и Germall II в качестве консерванта. Перед использованием должен быть разведён водой в 25 раз.

Показатели нестабильности реагентов
Субстрат **HRP**-ТМБ должен быть бесцветным или слабо голубоватым. Синяя окраска свидетельствует о том, что реагент был контаминирован, и его следует улитилизровать.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *in vitro*.

- Только для профессионального использования.
- Пожалуйста, ознакомьтесь с документом № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными нормативами.
- Обращайтесь с образцами крови пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Следуйте национальным руководствам по утилизации биологических отходов.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Так как не существует метода, полностью исключающего наличие какого-либо инфекционного заболевания, передающегося через кровь, то при работе и утилизации с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Набор CanAg CA15-3 EIA разработан для тестирования сыворотки. Соберите кровь из вены венепункцией, отделите сыворотку стандартными методами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образцы могут храниться при 2-8˚С в течение 24 часов. Для более длительного хранения аликвотируйте образцы и храните их при -70°С или ниже. Для длительного хранения образцов не следует использовать пробирки с гелем. Не храните образцы в морозильнике с функцией авторазмораживания. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºС в течение ночи, а затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. **Микропланшетный шейкер**
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, примерно 200 об/мин или 700-1100 колебаний/мин.
2. **Микропланшетный вошер**
   Автоматическое устройство для промывки, способное выполнять 1 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку за цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. **Микропланшетный спектрофотометр (ридер)**
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. **Высокоточные пипетки**
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками, для внесения объёмов в микролитрах и миллилитрах.. Наличие 8-канальной пипетки для внесения объёма 100 мкл на лунку желательно, но не обязательно.
5. **Дистиллированная или деионизированная вода**
   Для приготовления промывочного раствора.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры (20-25˚С). Для получения точных результатов анализ следует проводить при комнатной температуре 20-25˚С. Замороженные образцы необходимо медленно довести до комнатной температуры, а затем аккуратно и тщательно перемешать перед тестированием.
3. Перед внесением калибраторов и образцов сывороток пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их точной идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа. Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендуется использовать режим работы «по стрипу» и режим промывки «с переливом», с объёмом вносимого буфера по 800 мкл. Вошер не следует оставлять на длительное время заполненным буфером для промывок, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому дозированию и аспирации жидкости.
5. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к загрязнению. Для лучшей стабильности TMB HRP-субстрата, чтобы избежать загрязнения реагента налейте необходимое количество реагента из флакона в тщательно очищенный резервуар или, предпочтительно, в одноразовый пластиковый лоток. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).
6. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику дозирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте переноса материала из лунки в лунку, удерживая наконечник пипетки чуть выше верхней части лунки и не прикасайтесь к пластиковому стрипу или поверхности жидкости. Правильный метод пипетирования имеет особое значение при работе с раствором TMB HRP-субстрата.

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
Промывочный раствор	2 недели при 2-25°С в герметичном контейнере

Налейте 50 мл концентрата буфера для промывок в чистый контейнер и разведите в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Раствор антител	3 недели при 2-8°С в герметичном контейнере

Приготовьте нужный объем раствора антител, смешав по 50 мкл трейсера, HRP-анти-CA15-3 и 1 мл биотин-анти-CA15-3 на стрип (см. таблицу ниже).

Кол-во стрипов	Трейсер, HRP-анти-CA15-3 (мкл)	биотин-анти-CA15-3 (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

Убедитесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Альтернативно: Вылейте содержимое раствора трейсера, HRP-анти-CA15-3, во флакон с биотин-анти-CA15-3 и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера, HRP-анти-CA15-3, перенесен во флакон с биотин-анти-CA15-3.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Замечание: Раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8˚С. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов в этот период. Храните раствор правильно.

Процедура анализа

Выполняйте каждое измерение калибраторов, контролей и образцов сывороток пациентов в дублях. Калибровочную кривую необходимо строить при каждом анализе. Все реагенты и образцы перед использованием должны быть доведены до комнатной температуры (20-25°С).

1. Начните с приготовления буфера для промывок и раствора антител. Важно использовать чистые контейнеры. Тщательно следуйте указаниям в инструкции.
2. Разведите образцы сывороток 1:41, смешав 25 мкл образца и 1 мл буфера для разведения образцов. **Замечание:** калибраторы CA15-3 и контроли 1 и 2 CA15-3 разводить **не надо**.
3. Установите необходимое количество стрипов в рамку-держатель. Незамедлительно поместите неиспользуемые стрипы в пластиковый пакет с влагопоглотителем и закройте его. Промойте каждый стрип один раз буфером для промывок. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
4. Внесите по 25 мкл калибраторов CA15-3 (кал 0, 15, 50, 125, 250), контролей (к1 и к2) и разбавленных образцов сывороток пациентов (обр) в лунки микропланшета согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. 0	кал. 250	обр.2		
B	кал. 0	кал. 250	обр.2		
C	кал. 15	к. 1	и т. д.		
D	кал. 15	к. 1			
E	кал. 50	к. 2			
F	кал. 50	к. 2			
G	кал. 125	обр. 1			
H	кал. 125	обр. 1			

5. Внесите по 100 мкл раствора антител в каждую лунку, используя высокоточную пипетку на 100 мкл (или восьмиканальную высокоточную пипетку). Избегайте соприкосновения наконечников пипетки со стрипом или поверхностью жидкости и переноса реагента из лунки в лунку.
6. Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 5 минут) при комнатной температуре (20-25°С) с постоянным встряхиванием на микропланшетном шейкере.
7. Промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 «Замечаний по процедуре анализа».
8. Внесите по 100 мкл ТМБ HRP-субстрата в каждую лунку, в той же последовательности, как в п. 4. Раствор субстрата следует вносить по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
9. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным встряхиванием на микропланшетном шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
10. Немедленно считайте ОП на спектрофотометре при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, ОП может быть определена, как описано ниже.

Аль. 10. Внесите 100 мкл стоп-раствора и перемешайте. После этого считайте значения ОП на микропланшетном спектрофотометре при 405 нм не позднее, чем через 15 минут после внесения стоп-раствора.

Диапазон измеряемых значений

С использованием набора CanAg CA15-3 EIA возможно измерить концентрацию CA15-3 в диапазоне 1-250 Ед/мл. Если уровень CA15-3 в образце выше ожидаемого диапазона измеряемых значений, перед проведением анализа его необходимо развести буфером для разведения образцов в 1/400 и 1/4000 раз.

Контроль качества

Для ежедневного контроля достоверности результатов анализа используют Контроль 1 и Контроль 2 CA15-3. Допустимый диапазон указан на этикетках флаконов каждого контроля.

Если результаты, полученные для контролей, не укладываются в допустимые диапазоны, тщательно проверьте все реагенты и ридер и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток для обеспечения точности результатов анализа.

Референсные материалы

Так как не существует общепринятых референсных материалов для антигена MUC-1 (CA15-3), калибраторы данного набора CanAg CA15-3 EIA прокалиброваны по набору внутренних референсных стандартов.

Расчет результатов

Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру постройте калибровочную кривую, используя концентрацию каждого калибратора CA15-3, указанную на этикетке флакона.

Для автоматического расчета результатов определения CA15-3 рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 Ед/мл.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк.
- Интерполяция *от точки к точке*. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.
- *Квадратичная* регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 Ед/мл.

Замечание: не используйте 4-параметрическую или линейную регрессию для расчёта результатов анализа данным методом.

Для ручных расчетов, постройте калибровочную кривую, откладывая значение ОП (А), полученное для каждого калибратора, против соответствующей концентрации калибратора CA15-3 (в Ед/мл) (см. рисунок ниже). Значения концентраций CA15-3 в тестируемых образцах могут быть рассчитаны по калибровочной кривой, с использованием среднего значения ОП, полученного для образца.

Если в образце уровень CA15-3 выше 250 Ед/мл, для получения точных результатов разбавленный образец (1/41) необходимо дополнительно развести в 10 или в 100 раз буфером для разведения образцов.

Разведение в 10 раз = 50 мкл образца + 450 мкл буфера для разведения образцов

Разведение в 100 раз = 50 мкл образца, разведённого в 10 раз + 450 мкл буфера для разведения образцов

Концентрация CA15-3 в разведенных образцах рассчитывается следующим образом:

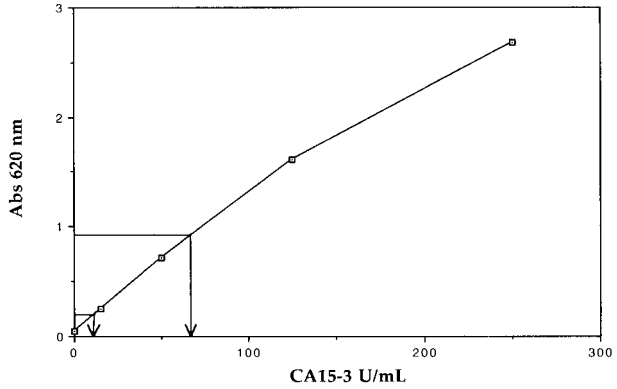
Разведение в 10 раз: 10 х значение, полученное по калибровочной кривой

Разведение в 100 раз: 100 х значение, полученное по калибровочной кривой

Пример результатов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец	Значения калибраторов	Значения поглощения (А)	CA15-3 Ед/мл
Калибратор 0	0 Ед/мл	0.044	
Калибратор 15	15 Ед/мл	0.252	
Калибратор 50	50 Ед/мл	0.723	
Калибратор 125	125 Ед/мл	1.612	
Калибратор 250	250 Ед/мл	2.680	
Образец А		0.241	14.1
Образец В		0.895	63.1



Пример (не используйте эту кривую или таблицу выше для определения фактических результатов)

Ограничения метода

Уровни CA15-3 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор CA15-3 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в совокупности с результатами других исследований и процедур, используемых в диагностике и мониторинге больных, и определение CA15-3 не должно замещать другие клинические исследования.

Присутствие антител к реагентам (человеческие анти-мышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), в образцах сывороток пациентов, могут иногда влиять на результаты анализа, не смотря на то, что в буфер добавлены блокирующие агенты.

На результаты анализа может влиять биотин, давая ложные низкие результаты. Это необходимо учитывать при тестировании образцов сывороток больных, получающих биологические добавки или терапию с высоким (> 5 мг в день) или очень высоким (300 мг в день) содержанием биотина. Максимальный уровень в сыворотке наблюдается через 1-3 часа после приёма, период полувыведения составляет приблизительно 8-16 часов, в зависимости от функции почек (9,10). В исследовании авторов Grimsey et al. (9) показано, что концентрация биотина в образце достигла 30 нг/мл через 8 часов после приёма 10 мг биотина. Больным, получающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить приём биотина не менее, чем за 2 дня перед взятием крови (11).

Ожидаемые значения

CA15-3 был измерен данным методом у 51 здоровой женщины-донора крови. Среднее значение составило 15 Ед/мл, со стандартным отклонением 6,8. Медиана составила 13.8 Ед/мл, в диапазоне 6-36 Ед/мл. Нижняя и верхняя границы нормального диапазона рассчитывали согласно рекомендациям IFCC для непараметрического статистического метода. Референсный интервал содержит центральную 95% фракцию референсного распределения. Референсные пределы могут быть установлены как 2,5% (нижний) и 97,5% (верхний) квантили. Эти пределы отсекают фракцию по 2.5% каждого хвоста распределения. Непараметрические расчеты:

N=51

Фракция	Референс-граница (Ед/мл)
2,5-й (нижний)	7
97,5-й (верхний)	36

У 94% здоровых женщин значения были ниже 30 Ед/мл. Рекомендовано каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, отбор пациентов и т. д. Также, следует иметь в виду, что собственные исходные результаты для каждого пациента являются наиболее важным ориентиром для интерпретации результатов определения маркеров.

Характеристики набора

Точность

Общая точность оценивалась согласно NCCLS EP5-A (7) с использованием 4 уровней концентраций пулированной замороженной сыворотки, содержащей добавленный человеческий CA15-3. Каждый образце был произвольно пипетирован (n=2/анализ) и проанализирован дважды в день, каждый день в течение 20 дней подряд. Анализ проводился в течение 40 месяцев не менее чем тремя лаборантами и с использованием 20 различных комбинаций реагентов CanAg CA15-3 EIA.

Образец	Реплики	Среднее (Ед/мл)	SD (Ед/мл) внутри серии	CV% внутри серии	SD (Ед/мл) между сутками	CV% между сутками
CA15-3 1	80	15,8	0,55	3,5	1,16	7,3
CA15-3 2	80	57,0	1,73	3,0	6,37	11
CA15-3 3	80	78,6	2,93	3,7	5,29	6,7
CA15-3 4	80	148	4,86	3,3	8,37	5,6

Предел обнаружения

Предел обнаружения для данного набора CanAg CA15-3 EIA составил < 1 Ед/мл и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения, по формуле:

$$\frac{2\text{xSD Калибратора 0}}{\text{OD Калибратора 15} - \text{OD Калибратора 0}} \times 15 \text{ Ед/мл}$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки были приготовлены добавлением человеческого антигена CA15-3 к нормальным образцам сыворотки. % извлечения антигена был найден в диапазоне 95-110%.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 7 500 Ед/мл.

Замечание: в пробах с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый (и даже желтый при очень высоких концентрациях). Это приводит к ложно низкой оптической плотности при 620 нм и в экстремальных случаях оптическая плотность может падать и попадать в пределы калибровочной кривой, что может быть расценено как Хук-эффект.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Линейность
Образцы пациентов были разведены буфером для разведения образцов и проанализированы. Полученные значения составили 93-102% от ожидаемых значений в диапазоне 25-250 Ед/мл.

Специфичность
Метод основан на использовании 2 типов мышиных моноклональных антител: захватывающих антител - Mab Ma695, взаимодействуют с сиалированным углеводным эпитопом, и детектирующих антител - Mab Ma695, специфичных для PD**TRPAP**G гидрофильным участком ядра белка. Возможные источники интерференции были определены согласно рекомендации NCCLS EP7-P (8). Были проверены следующие вещества в определенных концентрациях и показано, что они не оказывают значительной интерференции:

	Концентрация с незначительной (±10%) интерференцией
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин неконъюгированный	0,6 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином
Для оценки интерференции биотина было выполнено специальное исследование. Образцы контрольных сывороток с низкими и высокими концентрациями аналита были обогащены до конечной концентрации биотина 60, 200 и 600 нг/мл. Для каждого образца определяли среднюю концентрацию CA15-3 и рассчитывали процент извлечения для каждой концентрации биотина, по формуле:
Извлечение (%) = 100 x (средняя концентрация CA15-3 в образце, обогащённом биотином/ средняя концентрация CA15-3 в образце при добавлении только буфера).

Уровень CA15-3	Конц. (нг/мл) биотина	Ожидаемая конц. CA15-3 (Ед/мл)	Полученная конц. CA15-3 (Ед/мл)	Извлечение (%)
низкая	60	11,5	11,7	101
высокая	60	90,5	88,5	98
низкая	200	11,4	11,7	102
высокая	200	94,3	89,9	95
низкая	600	11,6	11,9	102
высокая	600	90,9	91,4	101

Интерференции при концентрации биотина до 600 нг/мл не выявлено.

Гарантии
Характеристики набора, представленные выше, получены при точном соблюдении процедуры метода. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Bon, G., Kenemans, P., Yedema, C.A., vanKamp, G.J., Nijman, H.W., and Hilgers, J. (1990) Clinical relevance of the tumor marker CA15.3 in the management of cancer patients in "From Clone to Clinic" p. 111-122, Crommelin and Schellekens (eds.) Kluwer Academic Publishers
2. Nilsson O., Karlsson B., Lindholm L., Pettersson A. (1994) Development of assays for determination of MUC-1 breast cancer antigen, 7th Symposium on Tumor Markers, Hamburg 1993, R Klapdor (ed) Current Tumor Diagnostics: Applications, Clinical Relevance, Research, Trends. W. Zuckswerdt Verlag München, 1994.
3. Baeckström D., Nilsson O., Price MR, Lindholm L., and Hansson GC. (1993) Discrimination of MUC1 mucins from other Sialyl-Le ª-carrying glycoproteins by colon carcinoma cells using a novel monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 53:755.
4. Blockzjil A, Nilsson K, and Nilsson O. (1998) Epitope characterization of MUC1 antibodies *Tumor Biology* 19 suppl. 1:46-56
5. Price M.R. et al., (1998) Summary Report on the ISOBM TD-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against the MUC1 Mucin *Tumor Biology* 19 suppl. 1:1-20
6. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: 26-29.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
9. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
10. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
11. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg CA15-3 EIA Кат. N 200-10

Перемешайте компоненты непосредственно перед использованием. Соблюдайте условия шейкирования в соответствии с инструкцией.

Шаг	Флакон/Планшета	Действия
1. Приготовить промывочный раствор	Концентрат промывочного раствора	Развести 50 мл концентрата промывочного раствора в 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды.
Приготовить раствор антител	Трейсер, HRP-анти-CA15-3 Биотин анти-CA15-3	Смешать 50 мкл трейсера, HRP-анти-CA15-3, с 1 мл биотин-анти-CA15-3 для анализа 1 стрипа: Кол-во стрипов / Трейсер, HRP-анти CA15-3 мкл / Биотин 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
2. Развести образцы	Буфер для разведения образцов	Смешать 25 мкл образца пациентов с 1 мл буфера для разведения образцов.
3. Промывка	Микропланшет	Промыть каждую лунку один раз промывочным раствором
4. Внести калибраторы, контроли и разведённые образцы	Калибраторы 0, 15, 50, 60, 125, 250 Контроли 1, 2	По 25 мкл в каждую лунку
5. Внести раствор антител	Раствор антител	По 100 мкл в каждую лунку
6. Инкубация	Микропланшет	2 часа, с шейкированием, при комнатной температуре
7. Промывка	Микропланшет	Промыть каждую лунку по 6 раз промывочным раствором
8. Внесение ТМБ HRP-субстрата	Субстрат ТМБ	По 100 мкл в каждую лунку
9. Инкубация	Микропланшет	30 минут, с шейкированием, при комнатной температуре
10. Считывание ОП	Микропланшет	620 нм
10 альт. Добавить стоп-раствор	Стоп-раствор	По 100 мкл в каждую лунку
11 альт. Инкубация	Микропланшет	1 мин, с шейкированием, при комнатной температуре
12 альт. Считывание оптической плотности	Микропланшет	Считать при 405 нм, не позднее, чем через 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg Free PSA EIA

Кат. N 350-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 11.2020

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg Free PSA EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg Free PSA EIA предназначен для количественного определения свободного простат-специфического антигена (свободного ПСА) в человеческой сыворотке.

Введение и объяснение метода

Специфический антиген простаты человека представляет собой мономерный гликопротеин с молекулярной массой около 32 кД, сериновую протеазу с химотрипсин подобной специфичностью, продуцируемый секреторным эпителием предстательной железы (1).
ПСА в норме секретируется в семенную жидкость и играет функциональную роль в расщеплении белков семенных пузырьков и разжижении семенного сгустка (2). В кровотоке в норме присутствуют только очень низкие уровни ПСА, и повышение его концентрации в сыворотке свидетельствует о патологии предстательной железы, включая доброкачественную гиперплазию простаты и рак простаты. Определение ПСА в настоящий момент широко используются для выявления и мониторинга пациентов с раком простаты и этот маркер признан лучшим серологическим маркером для рака простаты (3).
Показано, что ПСА образует стабильные комплексы с различными ингибиторами протеаз и большая часть ПСА в сыворотке приходится на комплекс с α1-антихимотрипсином (ПСА-АХТ) (4). Однако существуют большие различия в пропорциях свободного ПСА и ПСА-АХТ комплекса у различных пациентов. Большое количество исследований показали, что доля свободного ПСА выше при доброкачественных заболеваниях предстательной железы, чем при раке простаты (4, 5). Данный набор CanAg Free PSA EIA предназначен для специфического определения свободного ПСА без какой-либо перекрестной реактивности с комплексом ПСА-АХТ (6).

Принцип метода

Настоящий набор CanAg Free PSA EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич”-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

технологии для определения свободного ПСА. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными моноклональными антителами к свободному ПСА и моноклональными антителами к ПСА, меченными пероксидазой хрена (HRP) в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3,5,5-тетраметилбензидин) и проходит ферментная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству свободного ПСА, присутствующему в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 405 нм после добавления стоп-раствора.

Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация свободного ПСА в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg Free PSA EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора проставлен снаружи коробки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов и наборов.
- Храните набор при 2-8ºC.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 плашка	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 микролунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закрыть, хранить сухим.

Калибраторы ПСА 6 флаконов 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

ПСА 0 мкг/л	0.75 мл
ПСА 0.3 мкг/л	0.75 мл
ПСА 1 мкг/л	0.75 мл
ПСА 2 мкг/л	0.75 мл
ПСА 5 мкг/л	0.75 мл
ПСА 10 мкг/л	0.75 мл

Калибраторы находятся в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% метилизотиазолином (МИТ) в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Контроли ПСА (свободного) 2 флакона 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

ПСА (св.) контроль 1	0.75 мл
ПСА (св.) контроль 2	0.75 мл

Контроли находятся в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Готовы для использования.

Биотин Анти -своб.ПСА 1 фл. 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Биотин анти-ПСА моноклональные антитела мыши, ≈ 1.5 мкг/мл.

Фосфатный буфер (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим иммуноглобулином, блокирующими агентами, ТВИН 20, инертным голубым красителем, 0.01% МИТ в качестве консерванта. Готовый к использованию.

HRP- Анти -своб.ПСА Трейсер 1 фл. 0.75 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Сток-раствор пероксидазы хрена анти-ПСА моноклональных антител мыши, ≈ 20 мкг/мл. Должен быть смешан с раствором биотинилированных **Анти -своб.ПСА** антител перед использованием.

HRP-Субстрат ТМБ 1 фл. 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3 ’, 5, 5’ тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

Стоп-раствор 1 фл. 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит 0,12 М раствор соляной кислоты (HCl). Готов к использованию.

Промывочный буфер (x25) 1 фл. 50 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности

Раствор ТМВ HRP-субстрата должен быть бесцветным или слегка голубоватым. Более темное голубое окрашивание свидетельствует о том, что реагент был загрязнен и должен быть утилизирован.

Предупреждения и меры предосторожности

Набор предназначен только для диагностики *in vitro.*

- Только для профессионального использования.
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.
- Обращайтесь с пробами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Соблюдайте местные инструкции по утилизации всех отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предупреждение
Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие заболеваний, передающихся через кровь, обращаться и утилизировать материалы, входящие в состав данного набора необходимо как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Сбор и подготовка образцов
Набор CanAg Free PSA EIA предназначен для использования сыворотки. Соберите кровь из вены методом венепункции, отделите сыворотку обычной процедурой. Образцы могут храниться при 2-8ºC в течение 24 часов и 12 месяцев при -20ºC. Для более длительного хранения храните образцы при температуре при -70°C или ниже. Образцы не должны храниться в саморазмораживающихся холодильниках. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем приведите образцы к комнатной температуре перед анализом.
Повышенные уровни свободного ПСА могут ожидаться после манипуляций с простатой. Сбор образцов рекомендуется проводить перед ректальным обследованием. После хирургических процедур с простатой, таких как биопсия или трансуретральная резекция рекомендуется подождать не менее 6 недель перед взятием образцов сыворотки для тестирования свободного ПСА (7). Необходимо учитывать, что терапия ДГП фенастеридом снижает уровень свободного ПСА (7).

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки
1. Шейкер для микропланшета.
Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять от 1 до 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр
с длиной волны 450 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
с одноразовыми пластиковыми наконечниками для раскапывания микрообъемов жидкостей (микролитры и миллилитры). 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна..
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
Для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа
1. Для получения точных результатов при использовании набора CanAg Free PSA EIA важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºC. Замороженные образцы после оттаивания должны быть аккуратно, но тщательно перемешаны.
3. Перед раскапыванием калибраторов, контролей и образцов сывороток пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов твердофазное антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
Автоматическая промывка (с использованием вошера): Следуйте инструкциям производителя прибора по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться, что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
5. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к контаминации. Для получения оптимальной стабильности TMB HRP-субстрата перенесите необходимое количество из флакона в тщательно вымытый сосуд или предпочтительно одноразовый пластиковую емкость для предотвращения загрязнения реагента. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники (или наконечники для диспенсеров).
6. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники и соблюдаете правильную технику пипетирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте прикосновения к стрипу или поверхности жидкости и переноса реагента из лунки в лунку. Это особенно важно при работе с HRP-субстратом ТМБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление реагентов	Стабильность
Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºС в герметичном контейнере

Налейте 50 мл промывочного концентрата в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Раствор антител 3 недели при 2-8ºС

Приготовьте нужный объем раствора антител смешением 50 мкл трейсера, HRP-антител к свободному ПСА, с 1 мл биотинилированных антител к свободному ПСА на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера, HRP-анти св. ПСА (мкл)	Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления раствора антител.

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с трейсером, HRP-антителами к свободному ПСА во флакон с биотинилированными антителами к свободному ПСА и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера перенесен во флакон с биотинилированными антителами к свободному ПСА.

Замечание: Раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºС. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

Процедура анализа

Проводите каждое измерение калибраторов, контролей и проб пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть приведены к комнатной температуре (20-25ºС).

1. Начните с приготовления буфера для промывок и раствора антител. Очень важно использовать чистые контейнеры. Тщательно следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. Поместите неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте по 50 мкл калибраторов ПСА (Кал. 0, 0.3, 1, 2, 5, 10), контролей (к) и образцов сывороток пациентов (обр) в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	Кал. 0	Кал. 5	обр. 1		
B	Кал. 0	Кал. 5	обр. 1		
C	Кал. 0.3	Кал. 10	обр. 2		
D	Кал. 0.3	Кал. 10	обр. 2		
E	Кал. 1	к.1	и т. д.		
F	Кал. 1	к.1			
G	Кал. 2	к. 2			
H	Кал. 2	к. 2			

4. Добавьте по 100 мкл раствора антител в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкости, удерживая наконечники чуть выше верхнего края лунок при дозировании, и избегайте касания наконечниками стрипов или поверхности жидкости.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 10 минут) при комнатной температуре (20-25ºС) с постоянным перемешиванием плашки на шейкере для микропланшет.
6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п.4.”Замечаний по процедуре анализа”.
7. Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл TMB HRP-субстрата, в той же последовательности, как в шаге 4. Раствор TMB HRP-субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю ячейку не превышало 5 минут.
8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 30 минут (± 5 мин.) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 450 нм.

Диапазон измеряемых значений

Набор CanAg Free PSA EIA предназначен для измерения в диапазоне концентраций 0.03 – 10 мкг/л. Если концентрация свободного ПСА в образце превышает данный диапазон, необходимо развести его нормальной человеческой сывороткой перед анализом. ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотку, используемую для разведения, также необходимо проанализировать вместе с образцом, для определения уровня эндогенного свободного ПСА (см. «Расчет результатов»).

Контроль качества

Контрольные сыворотки свободного ПСА, поставляемые с набором, уровни 1 и 2, могут быть использованы для оценки достоверности результатов анализа. Диапазоны допустимых значений, специфичный для контрольных сывороток, указаны на этикетках флаконов. Если получаемые для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

контрольных сывороток значения не попадают в диапазон допустимых значений, необходимо провести полную проверку реагентов и оборудования и повторить анализ.
Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референсные материалы.
I Международный стандарт 96/668 может быть использован в качестве референсного стандарта.
Значения калибраторов свободного ПСА или контролей, поставляемых с набором, были получены по набору внутренних стандартов, прокалиброванных по I Международному стандарту.

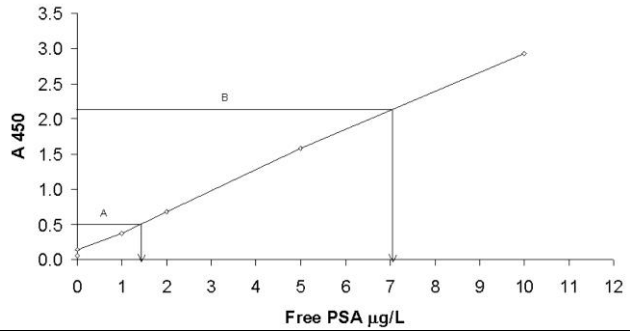
Расчет результатов
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора свободного ПСА, указанную на флаконах.
Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в стандартную кривую со значением 0 мкг/л.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого калибратора против соответствующих концентраций свободного ПСА (в мкг/л) (см. рисунок ниже). Значения концентраций свободного ПСА в образцах для каждого пациента находятся из калибровочной кривой.

Пример результатов



Образец	Значения	Средняя ОП	Свободный
	калибраторов	(А)	ПСА, мкг/л
Калибратор 0	0 мкг/л	0.054	
Калибратор 0.3	0.3 мкг/л	0.148	
Калибратор 1	1 мкг/л	0.369	
Калибратор 2	2 мкг/л	0.683	
Калибратор 5	5 мкг/л	1.580	
Калибратор 10	10 мкг/л	2.930	
Образец А		0.522	1.480
Образец В		2.181	7.147

Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Расчет результатов с разбавлением образцов
Если образец дает значение свободного ПСА больше 10 мкг/л, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 нормальной сывороткой и проанализировать повторно для получения точной концентрации свободного ПСА. Замечание: В образце, используемом для разведения, также необходимо определить уровень свободного ПСА, для определения эндогенной концентрации.
В этом случае концентрация свободного ПСА в исходном образце рассчитывается следующим образом:

Разведение 1/10:
$10 \times ([\text{свободного ПСА}]_{\text{разводимого образца}} - (0.9 \times [\text{свободного ПСА}]_{\text{нормальной мужской сыворотки}}))$

Ограничения метода
Уровни свободного ПСА не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор свободного ПСА не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний и тестирование свободного ПСА не должно замещать другие клинические исследования.
Калибраторы своб. ПСА данного набора не следует использовать для изучения извлечения свободного ПСА. Для этого следует использовать сильно повышенные значения образцов пациентов.
Антитела к реагентам (человеческие анти-мышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), которые могут присутствовать в образцах сывороток пациентов, могут иногда влиять на результаты анализа, не смотря на то, что в буфер добавлены блокирующие агенты.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (10, 11). В исследовании Grimsey и др. (10) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (12).

Ожидаемые значения

Измерения свободного ПСА могут быть использованы совместно с эквимолярным определением общего ПСА, таким, как например, CanAg Free PSA EIA (340-10) для получения пропорции свободный ПСА/общий ПСА.

С помощью наборов CanAg PSA EIA и CanAg Free PSA EIA были проанализированы образцы сывороток 52 мужчин и объективно установленным диагнозом доброкачественная гиперплазия простаты (ДГП) и 77 мужчин с раком простаты (РП):

Диагноз (n)	Свободный ПСА/общий ПСА				
	медиана	Min.	Max.	среднее	(95% доверительный интервал)
ДГП (52)	0.18	0.04	0.42	0.19	(0.17–0.21)
РП (77)	0.09	0.02	0.53	0.12	(0.10–0.14)

Выбор уровня cut-off, используемого в клинической практике, зависит от конкретного клинического применения, например, необходимо ли оптимизировать чувствительность либо специфичность. Чувствительности (% правильно определенных РП) и специфичности (% правильно определенных ДГП) для различных уровней cut-off для отношения Свободный ПСА/общий ПСА приведены ниже:

Свободный ПСА/общий ПСА cut-off	Клиническая специфичность (ДГП > cut-off)			Клиническая чувствительность (РП < cut-off)		
	n	%	95% доверительный интервал	n	%	95% доверительный интервал
0.23	14 (52)	27	(16–41)	69 (77)	90	(81–95)
0.16	36 (52)	69	(55–81)	64 (77)	83	(73–91)
0.08	48 (52)	92	(81-98)	30 (77)	39	(28-51)

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила применимость приведенных выше ожидаемых значений для собственной популяции и выполняемого метода (7).

Характеристики метода

Точность

Общая точность была рассчитана согласно руководству NCCLS EP5-A (15), с использованием четырех уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленный Свободный ПСА при 6 различных комбинациях реагентов набора CanAg Free PSA EIA. Каждый образец был случайным образом пипетирован (n=2/анализ) и протестирован дважды в день в течение 20 дней.

образец	реплики	среднее (мкг/л)	SD внутри серии (мкг/л)	CV внутри серии, %	SD между сутками (мкг/л)	CV между сутками %
Free PSA 1	80	0.38	0.01	1.9	0.01	3.0
Free PSA 2	80	1.44	0.02	1.6	0.04	2.6
Free PSA 3	80	3.46	0.05	1.6	0.08	2.3
Free PSA 4	80	6.91	0.09	1.3	0.12	1.8

Предел обнаружения

Предел обнаружения для набора CanAg Free PSA EIA составил < 0.03 мкг/л и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения (n=24) и подсчитан по формуле:

$$\frac{2x\ SD\ Калибратор\ 0}{OD\ Калибратор\ 0.3 - OD\ Калибратор\ 0} \times 0.3\ мкг/л$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки были приготовлены добавлением аликвот образцов с сильно повышенным значением ПСА к нормальным образцам сывороток мужчин. % извлечения антигена составил ±15% ожидаемого значения.

Замечание: Не следует использовать наборы калибраторов для определения извлечения.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями > 5000 мкг/л.

Линейность

Образцы сывороток пациентов были разбавлены нормальными образцами сывороток мужчин и проанализированы. Полученные значения составили ± 10% от ожидаемых значений свободного ПСА.

Аналитическая специфичность:

CanAg Free PSA EIA основывается на двух различных типах мышиных моноклональных антител, антитела PSA30 и антитела PSA66, направленных на два эпитопа свободного ПСА (6).

Перекрестная реактивность

Моноклональные антитела PSA30 и PSA66 демонстрируют <1% перекрестной реактивности с комплексом ПСА-АХТ и отсутствие перекрестной реактивности с человеческим kallikrein 2 (13). При различных пропорциях ПСА_АХТ и свободного ПСА, используемых при исследовании с набором CanAg Free PSA EIA, уровень перекрестной реактивности определен как 2%.

Интерферирующие вещества

Были протестированы следующие вещества в указанных концентрациях и не обнаружена интерференция с ними:

	Концентрация с незначительной (±10%) интерференцией
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин, несвязанный	0.4 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 6, 15, 30 и 60 нг/мл. Средняя концентрация свободного ПСА была определена для каждого образца, и процент извлечения для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. Свободного ПСА с добавкой биотина / Средняя конц. Свободного ПСА с добавкой только разбавителя).

Уровень свободного ПСА	Конц. Биотина, нг/мл	Ожидаемая конц. свободного ПСА, µг/л	Наблюдаемая конц. свободного ПСА, µг/л	Извлечение, %
Низкая	6	0,82	0,82	100
Высокая	6	8,47	8,55	101
Низкая	15	0,82	0,82	100
Высокая	15	8,61	8,55	99
Низкая	30	0,81	0,71	88
Высокая	30	8,26	6,93	84
Низкая	60	0,81	0,55	68
Высокая	60	8,30	4,96	60
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 24 нг/мл				

Сравнение методов

Тест-система CanAg Free PSA EIA (номер по каталогу 350-10) сравнивалась с двушаговой тест-системой CanAg Free PSA EIA (330-10). Набор использовался для анализа Значения 127 сывороток мужчин находились в диапазоне 0-9 мкг/л, а линейный регрессионный анализ дал следующие результаты:

$$[\text{свободный ПСА}]_{\text{кат. номер 350-10}} = 1.02 \times [\text{свободный ПСА}]_{\text{кат. номер 330-10}} - 0.06 \qquad r = 0.99$$

Гарантии

Характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159–163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76: 1899–1903.
3. Haese A., Becker C., Diamandis E., and Lilja H., (2002) Adenocarcinoma of the Prostate In: „Tumor Markers. Phusiology, Pathobiology, Technology, and Clinical applications". Eds. Diamandis et al., AACC Press, Washington, pp. 193-238.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T., Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α_1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 37: 1618–1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α_1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urology* 150: 100–105.
6. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. *Br J Cancer* 75(6):789–797, 1997.
7. Price C. P., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. (2001) Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*; 38: 188–216.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
10. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
11. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
12. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.
13. ISOBM TD-3 International Workshop on Monoclonal Antibodies against Prostate-Specific Antigen. *Tumor Biology*, 1999; 20 (suppl. 1): 1-94.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg Free PSA EIA Кат. N 350-10

Смешивайте компоненты прямо перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/Плашка	Действия
1. Приготовить буфер для промывок	WASHBUF 25X	Разбавить 50 мл концентрата буфера для промывок 1200 мл дистиллированной воды или деионизированной воды
Приготовить раствор антител	CONJ Anti-FPSA BIOTIN Anti-FPSA	Смешать 50 мкл трейсера, HPR- анти-своб.ПСА с 1 мл биотинилированных антител к свободному ПСА на каждый стрип: Кол-во стрипов / Трейсер, мкл / Биотинилированные антитела к свободному ПСА, 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
2. Промывка	MICROPLA	Промыть каждую ячейку один раз буфером для промывок
3. Добавить калибраторы, контроли и образцы	CAL PSA 0, 0.3, 1, 2, 5, 10 CONTROL FPSA 1, 2	50 мкл в каждую ячейку
4. Добавить раствор антител	**Рабочий раствор антител**	100 мкл в каждую ячейку
5. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре
6. Промывка	MICROPLA	Промыть каждую ячейку 6 раз промывочным раствором
7. Добавление ТМБ HRP-субстрата	SUBS TMB	100 мкл в каждую ячейку
8. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
9. Добавить стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую ячейку
10. Инкубация	MICROPLA	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
11. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считать при 450 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg ProGRP EIA

Кат. N 220-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

CE

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg ProGRP EIA

Назначение

Настоящий набор CanAg ProGRP EIA предназначен для количественного определения прогастрин релизинг пептида в сыворотке человека. Анализ на ProGRP предназначен для использования в качестве вспомогательного средства в дифференциальной диагностике и для наблюдения за пациентами с мелкоклеточным раком легких.
Проведение анализа на определение уровня прогастрин релизинг пептида у пациентов следует использовать в сочетании с прочими клиническими исследованиями, применяемыми при лечении пациентов с мелкоклеточным раком легких.

Введение и объяснение метода

GRP (гастрин релизинг пептид) — это гормон, секретируемый клетками мелкоклеточного рака легкого (SCLC). Хотя ожидалось, что определение уровня GRP в сыворотке будет эффективным для диагностики SCLC, определение концентрации GRP в сыворотке было невозможно из-за его нестабильности в кровотоке (1, 2). Его предшественник прогастрин релизинг пептид (ProGRP) более стабилен и может быть использован как серологический маркер GRP (3). Данный набор CanAg ProGRP EIA измеряет ProGRP (31-98) - С-концевую область, общую для различных вариантов сплайсинга человеческого ProGRP.
ProGRP экспрессируется в нейроэндокринных клетках и опухолях, включая мелкоклеточный рак легкого, недиффиринцированную крупноклеточную карциному легкого с нейроэндокринными очагами, медуллярный рак щитовидной железы и другие нейроэндокринные опухоли. Показано, что уровень ProGRP в сыворотке повышен у большой части больных с диагнозом SCLC, тогда как у пациентов с доброкачественными заболеваниями уровень маркера в норме (4-10).
Благодаря своей чувствительности и специфичности для SCLC, ProGRP эффективен в дифференциальной диагностике рака легкого. Дополнительная информация в диагностике SCLC может быть получена при сочетанном использовании определения ProGRP и NSE (8, 10, 11, 14). ProGRP также полезен в мониторинге ответа на терапию и выявления рецидива заболевания (11-13).
Повышенный уровень ProGRP может быть выявлен на ранней стадии мелкоклеточного рака легкого. Однако, так как частота встречаемости SCLC в общей популяции низкая, определение ProGRP не должно быть использовано для скрининга.

Принцип метода

Настоящий набор является твердофазным, одношаговым, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на использовании антител, специфичных к различным эпитопам, экспрессирующимся в ProGRP. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с высоко - очищенными биотинилированными анти - ProGRP поликлональными антителами и анти – ProGRP моноклональными антителами E - 146, мечеными пероксидазой хрена, в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. После инкубации стрипы промываются. Далее в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3,5,5-тетраметилбензидин) и проходит ферментная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству ProGRP в образце.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере при 620 нм (или возможно при 450 нм после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация ProGRP в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg ProGRP EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора проставлен снаружи коробки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов и наборов.
- Храните набор при 2-8ºC.

- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 планшет	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 разделяемых микролунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы ProGRP
6 флаконов по 1 мл, лиофил.

После разведения стабильны
3 дня при 2-8 ºC
2 месяца при -20 ºC и ниже

Лиофилизированные калибраторы содержат ProGRP экспрессируемый клеточной линией в белковом матриксе, инертный желтый краситель и не содержащий азида в качестве консерванта. Перед использованием необходимо развести в 1 мл дистиллированной или деионизированной воде. **ЗАМЕЧАНИЕ:** точные концентрации ProGRP специфичны для каждого лота и указаны на этикетках флаконов..

Контроли ProGRP 2 флакона

После разведения стабильны
3 дня при 2-8 ºC
2 месяца при -20 ºC и ниже

ProGRP контроль 1 1 мл
ProGRP контроль 2 1 мл

Лиофилизированные контроли содержат ProGRP экспрессируемый клеточной линией в белковом матриксе, не содержащий азида в качестве консерванта. Перед использованием необходимо развести в дистиллированной или деионизированной воде. **ЗАМЕЧАНИЕ:** точные концентрации ProGRP специфичны для каждого лота и указаны на этикетках флаконов.

Биотинилированные анти - ProGRP
1 фл. 15 мл 4 месяца при 2-8ºC

Аффинно очищенные Биотинилированные козьи поликлональные антитела к ProGRP, приблизительно 4 мкг/мл. Содержит фосфатно – солевой раствор буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, детергентом, инертным голубым красителем и не содержащим азида консервантом. Готов для использования.

Трейсер, HRP-меченые анти - ProGRP антитела
1 фл. 0.75 мл

4 месяца при 2-8ºC

Сток-раствор конъюгата пероксидазы хрена с анти - ProGRP моноклональными мышиными антителами, ≈ 21 мкг/мл. Содержит консервант, не содержащий азида. Перед использованием должен быть смешан с биотинилированными анти - ProGRP.

Разбавитель образцов 1 фл. 8 мл

4 месяца при 2-8ºC

Содержит 0.15 М хлорида натрия и консервантом, не содержащим азида, в безбелковом матриксе. Готов к использованию..

Субстрат ТМБ 1 фл. 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ). Готов для использования.

Стоп-раствор 1 фл. 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Готов к использованию. Содержит 0.12 М соляную кислоту..

Концентрат промывочного буфера
1 фл. 50 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз дистиллированной или деионизированной водой.

Показатели нестабильности
Раствор субстрата ТМВ должен быть бесцветный или слегка голубоватый. Голубой цвет свидетельствует о загрязнении реагента и раствор должен быть выброшен.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики in vitro

- Следуйте указаниям, приведенным в настоящей инструкции. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если имеются какие-либо отклонения от указаний, приведенных в настоящей инструкции.
- Обращайтесь со всеми образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными. С реагентами, содержащими компоненты человеческого происхождения, и с образцами человеческого происхождения рекомендуется обращаться согласно Стандарту OSHA по работе с патогенами (19). При работе с материалами, содержащими или потенциально содержащими инфекционные агенты необходимо соблюдать уровень безопасности 2 (20) или другой соответствующий уровень безопасности.
- Избегайте контакта с реагентами, содержащими пероксидазу хрена и соляную кислоту. При попадании реагентов на кожу или в глаза тщательно промойте водой.
- Следуйте локальным руководствам по утилизации всех отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сбор и подготовка образцов

Набор разработан для использования сыворотки. Соберите кровь обычной венепункцией, отделите сыворотку следуя общепринятым процедурам. Тестирование плазмы и других биологических жидкостей не было валидировано для данного метода CanAg ProGRP EIA. Для тестирования данным методом нельзя использовать пробирки для взятия крови, содержащие тромбиновый активатор свертывания, так как он может вызвать деградацию ProGRP. Образцы сыворотки должны быть обработаны немедленно после образования сгустка, или храниться при 2-8°C. Не используйте образцы сыворотки, хранившиеся при комнатной температуре (25°C) более трех часов, включая время свёртывания. Сыворотка может храниться при 2—8°C до 24 часов. Образцы сывороток должны анализироваться сразу же, как только их достали из холодильника, где они хранились при 2-8°C. Для более длительного хранения образцы должны быть заморожены при температуре -40°C или ниже. Перед тестированием позвольте образцам растаять и тщательно перемешайте на вортексе или переворачиванием 10 раз. Для получения точных результатов образцы не должны содержать фибрин, эритроцитов, или видимых частиц. Образцы сывороток пациентов, получающих антикоагулянтную или тромболитическую терапию могут содержать фибрин из-за неполного образования сгустка.

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. **Шейкер для микропланшет**
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700 – 1100 колебаний/мин.
2. **Микропланшетный вошер**
   Для достижения лучших результатов рекомендуем использовать автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять от 1 до 6 циклов промывки и с минимальным объемом внесения жидкости 800 мкл/лунку.
   Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. **Микропланшетный спектрофотометр**
   Длина волны 405 нм и диапазоном абсорбции от 0 до 3.0.
4. **Высокоточные пипетки**
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для раскапывания микрообъемов жидкостей. -канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна. Пипетки для дозирования микрообъемов жидкостей..
5. **Дистиллированная или деионизированная вода** для разведения калибраторов, контролей и приготовления промывочных растворов.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать инструкцию к настоящему набору CanAg ProGRP EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое.
   Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов.
   Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC). Для получения корректных результатов анализ следует проводить при температуре 20-28ºC. Замороженные образцы после оттаивания должны быть осторожно, но тщательно перемешаны. (См. раздел «сбор и подготовка образцов» выше).
3. Перед раскапыванием калибраторов и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
   Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. При обслуживании прибора, выполняйте необходимое число промывок, указанное производителем прибора, до начала использования прибора и после его использования. Рекомендуется использовать режим промывки «стрип» и режим заполнения лунок «оверфлоу», внося объём 800 мкл.

Замечание: очень быстрая скорость аспирации в сочетании с отсутствием замачивания может снизить точность анализа. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с буфером для промывок, так как иглы могут засориться и давать в дальнейшем неполную промывку - неполное внесение буфера для промывок и неполную аспирацию.

5. Раствор субстрат TMB очень чувствителен к контаминации. Для оптимальной стабильности раствора субстрата TMB, перенесите необходимое количество субстрата из флакона в тщательно промытый чистый резервуар, или, предпочтительно, одноразовую пластиковую ванночку, чтобы избегать контаминации реагента. Используйте только чистые одноразовые наконечники
6. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику дозирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте переноса материала из лунки в лунку, для этого не прикасайтесь к поверхности жидкости. Правильный метод дозирования имеет особое значение при работе с раствором HRP-субстрата TMB.

Приготовление реагентов	Их стабильность
Калибраторы ProGRP	3 дня при 2-8ºC 2 месяца при -20ºC или ниже

Внесите точно 1,0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте как минимум на 15 минут при комнатной температуре для полного растворения.. **ЗАМЕЧАНИЕ:** концентрация калибраторов указана на этикетках флаконов и должна быть использована для расчета результатов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроли ProGRP 3 дня при 2-8ºC
2 месяца при -20ºC или ниже

Внесите точно 1,0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Позвольте постоять 15 минут для растворения и тщательно перемешайте. **ЗАМЕЧАНИЕ:** диапазон ожидаемых значений указан на этикетках флаконов и должен быть использован для расчета результатов.

Промывочный раствор 2 недели при 2-25ºC в герметичном контейнере

Налейте 50 мл промывочного концентрата в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Раствор антител 12 часов при 2-8ºC

Приготовьте нужный объем раствора антител смешав по 50 мкл трейсера - HRP анти-ProGRP и 1 мл биотин анти-ProGRP для тестирования на 1 стрипе (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Трейсер, HRP анти-ProGRP (мкл)	Биотинилированные анти- ProGRP (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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора антител. ЗАМЕЧАНИЕ: Готовьте ровно столько раствора антител, сколько необходимо для анализа.

Процедура анализа
Все калибраторы, контроли и образцы должны анализироваться в дублях. Калибровочная кривая должна строиться при каждой постановке анализа. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC).
(См. раздел «сбор и подготовка образцов» выше).

1. Начните с приготовления калибраторов, контролей 1 и 2, раствора антител и промывочных буферов. Очень важно использовать чистые емкости. Строго следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. Поместите неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте 50 мкл калибраторов (кал, A, B, C, D, E, F), контролей (1 и 2) и проб пациентов в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. A	кал. E	обр. 1		
B	Кал. A	кал. E	обр. 1		
C	кал. B	кал. F	обр. 2		
D	кал. B	кал. F	обр. 2		
E	кал. C	конт. 1			
F	кал. C	конт. 1			
G	кал. D	конт. 2			
H	кал. D	конт. 2			

4. Добавьте 100 мкл Раствора антител в каждую ячейку, используя восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкостей между лунками, держите наконечник пипетки чуть выше верха лунки.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 2 час (± 10 минут) при комнатной температуре (20-25ºC) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшет.
6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 «Замечаний по процедуре анализа».
7. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку, в той же последовательности, как в п. 4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю ячейку не превышало 5 минут.
8. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Добавьте по 100 мкл стоп – раствора в каждую лунку. Тщательно перемешайте с помощью микропланшетного шейкера и считайте оптическую плотность при 450 нм в течение 15 минут после добавления стоп – раствора с помощью микропланшетного спектрофотометрического ридера.

Диапазон измеряемых значений
С помощью данного набора CanAg ProGRP EIA можно измерить концентрации ProGRP в диапазоне от 0 до 2000 нг/л. Если концентрация аналита в образце выше диапазона измеряемых значений, образец рекомендуется развести буфером для разведения образцов и проанализировать еще раз (см. «Расчет результатов в разведенных образцах»).

Контроль качества
Для контроля достоверности анализа используют Контроль1 и Контроль 2. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля. Если значений контролей не укладываются в указанный диапазон, тщательно проверьте все реагенты, точность пипеток, микропланшетный вошер, и спектрофотометр, и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референсный материал
Так как не существует международного референсного стандарта для антигена ProGRP, значения калибраторов данного набора ProGRP были установлены по набору внутренних стандартов производителя.

Расчет результатов
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора ProGRP, помеченной на флаконах.
Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Метод аппроксимации кубическим сплайном. Калибратор A должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 нг/л.
2. Интерполяция от точки к точке. Калибратор A должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 нг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (A), полученных для каждого калибратора ProGRP против соответствующих концентраций ProGRP (в нг/мл). Значения концентраций ProGRP в образцах для каждого пациента находятся из калибровочной кривой.

Замечание: если определение ProGRP используется для мониторинга течения заболевания, для расчётов необходимо использовать один и тот же метод аппроксимации.

Если образец дает значение ProGRP превышающее калибратор F, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 буфером для разведения образцов для получения точной концентрации ProGRP в образце. Перед каждым анализом готовьте свежие разбавления. Не разводите образец более, чем в 10 раз.

1 : 10 разбавление = 50 мкл образца + 450 мкл буфера для разведения образца

Концентрация ProGRP затем вычисляется следующим образом:
Разбавление 1/10: 10 x измеренное значение

Если разведённый в 10 раз образец дает значение ProGRP больше калибратора F, то в отчете должно быть указано: более 10x[концентрация стандарта F]. Например, если концентрация калибратора F 2000 нг/л, то в отчете надо указать: более 20 000 нг/л.

Ограничения метода

У больных с установленным онкологическим диагнозом уровень ProGRP может быть таким же как и у здоровых людей. Повышенный уровень ProGRP может выявляться у людей с доброкачественными патологиями, например, при почечной недостаточности (9). Таким образом, уровень ProGRP не может служить абсолютным доказательством присутствия или отсутствия злокачественного заболевания и ProGRP EIA не должен использоваться для скрининга рака. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в совокупности с результатами других исследований и диагностических процедур и тест ProGRP не должен заменять какое-либо установленное клиническое обследование.

Последовательные пары результатов, находящихся в пределах нормальных значений не должны использоваться для заключения о прогрессии заболевания.

Антитела к реагентам (человеческие анти-мышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела) в образцах сывороток пациентов могут иногда влиять на результаты тестирования, несмотря на то, что в буфер добавлены специфические блокирующие агенты.

Присутствие ревматоидного фактора в образце может влиять на результаты тестирования, давай ложные низкие результаты измерения ProGRP.

Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (10, 11). В исследовании Grimsey и др. (10) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (12).

Ожидаемые значения

В исследовании 626 практически здоровых людей концентрация ProGRP в 99% случаев была не выше 60 нг/л или в 95% случаев была не выше 43 нг/л. Медиана уровня в сыворотке составила 17.4 нг/л.

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений для интересующей популяции и процедур сбора образцов.

Характеристики набора

Точность

Точность оценивалась согласно руководству NCCLS EP5-A2 (17) с использованием 6 уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленный ProGRP. Каждый образец был произвольно пипетирован (n=2/анализ) и проанализирован дважды каждый день в течение 20 дней подряд, т. е. в 40 различных сериях испытаний, двумя различными операторами, с использованием 2х различных лотов ProGRP EIA. Данные из настоящего исследования показаны в таблице:

Образец	Лот реагентов	Репликии	Среднее значение (нг/л)	SD (нг/л) внутри серии	CV% внутри серии	Общий SD (нг/л)	Общий CV% между сериями
1	1	80	33	2.3	6.9	3.0	9.2
	2	80	33	1.4	4.2	1.5	8.9
2	1	80	72	1.6	2.2	4.1	5.7
	2	80	74	1.4	1.9	2.3	6.3
3	1	80	97	3.7	3.8	7.0	7.3
	2	80	96	3.6	3.7	3.1	6.5
4	1	80	333	7.2	2.2	12.9	3.9
	2	80	326	4.3	1.3	8.3	5.1
5	1	80	781	12.8	1.6	35.6	4.6
	2	80	759	11.8	1.6	16.2	4.3
6	1	80	1449	33.8	2.3	59.2	4.1
	2	80	1495	28.8	1.9	36.4	4.9

Предел обнаружения

Предел обнаружения соответствует верхнему пределу 95% доверительного интервала и представляет собой наименьшую концентрацию ProGRP антигена, которую можно достоверно отличить от ноля. Дизайн исследования предела обнаружения был разработан в соответствии с руководством NCCLS EP5-A2 (18). В исследовании калибратор B, поставляемый с набором ProGRP EIA был разведён калибратором A до 10 нг/л. Затем калибратор A (0) и разведённый калибратор B (10 нг/л) были протестированы в 30 репликах на серию испытаний, в 4 экземплярах, в два разных дня. Предел обнаружения данного метода ProGRP EIA составил < 10 нг/л.

Функциональная чувствительность

Функциональная чувствительность выражается как концентрация аналита в лунке, при которой общая CV

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

= 20%. Было выполнено исследование панели 5 образцов в 2 репликах каждый в двух различных анализах в течение 20 дней наборами двух лотов. Функциональная чувствительность метода ProGRP EIA составила < 20 нг/л.

Извлечение
Было выполнено исследование образцов, полученных добавлением растворов с известными концентрациями ProGRP к ProGRP EIA буферу для разведения. Концентрацию ProGRP в полученных образцах определяли данным методом ProGRP EIA, и извлечение, в процентах, было рассчитано как отношение измеренной концентрации ProGRP к ожидаемой концентрации ProGRP, рассчитанной в зависимости от количества добавленного ProGRP. Данные исследования приведены в таблице *:

образец	Добавленный антиген ProGRP (нг/мл)	Полученная концентрация ProGRP, результат тестирования (нг/мл)	Извлечение** %
1	80	94	117
	139	164	118
	742	821	111
	1464	1653	113
2	68	70	103
	128	135	106
	730	701	96
	1453	1518	104
3	79	83	105
	138	150	109
	741	790	107
	1463	1487	102
4	100	108	108
	157	178	114
	762	807	106
	1481	1590	107
5	108	116	108
	164	186	114
	770	829	108
	1489	1609	108

** - репрезентативные данные; результаты в конкретной лаборатории могут отличаться от приведенных данных.*
*** - % извлечения = полученная концентрация ProGRP (нг/л) / добавленный ProGRP (нг/л).*

Среднее извлечение по отдельным концентрациям, указанным выше. составило 108%.

Хук-эффект
Хук эффект не наблюдается в образцах с концентрациями ProGRP до > 1 500 000 нг/л.

Линейность разведения
В среднем линейность разведения метода ProGRP EIA составила 100 ±20%. Линейность данного метода ProGRP EIA оценивали согласно руководству NCCLS (CLSI) EP6-A (19). Образцы сывороток с высокими значениями ProGRP были разведены ProGRP EIA буфером для разведения образцов.
Для каждого разведения была определена концентрация ProGRP и был посчитан процент извлечения. Данные исследования приведены в таблице *:

образец	Коэффициент конечного разведения	Полученное значение (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	извлечение** (%)
	Без разведения	1526	1526	100
	1:1.11	1344	1373	98
	1:1.25	1242	1221	102
	1:1.67	901	915	98
	1:2.5	636	610	104
	1:5	342	304	112
	1:10	147	152	97

Данные по исследованию линейности при использовании рекомендованного разведения в 10 раз представлены в таблице*:

образец	**Конечное разведение**	**Полученное значение (нг/мл)**	**Ожидаемое значение (нг/мл)**	**извлечение** (%)**
A	Без разведения	1025	1025	100
	1:10	103	103	101
B	Без разведения	434	434	100
	1:10	48	43	111
C	Без разведения	1156	1156	100
	1:10	115	115	99

** - репрезентативные данные; результаты в конкретной лаборатории могут отличаться от приведенных данных.*
*** - % извлечения = полученная концентрация ProGRP x коэффициент разведения / концентрация ProGRP (нг/л) в неразведённом образце.*

В среднем извлечение в трёх разведённых образцах составило 103.6%.

Аналитическая специфичность
В среднем специфичность данного метода ProGRP EIA составила 100±15%. Для сравнения результатов тестирования сывороток, содержащих перечисленные ниже в таблице вещества, в указанных концентрациях, с результатами анализа контрольной сыворотки, были выполнены исследования, дизайн которых был разработан согласно руководству NCCLS EP7-A (20) по оценке интерференции. Показано, что перечисленные ниже в таблице вещества, в указанных концентрациях, не влияют на результаты тестирования данным методом.

Эндогенные потенциально влияющие вещества сыворотки	**Протестированные концентрации**
Триглицериды	30 мг/мл
Билирубин	0.2 мг/мл
Гемоглобин	4,5 мг/мл*
Общий белок	120 мг/мл

* Для образцов с концентрацией гемоглобина выше 4.5 мг/мл существует риск получения завышенных результатов при тестировании данным методом ProGRP EIA.

Химиотерапевтические потенциально влияющие лекарственные препараты	**Протестированные концентрации**
карбоплатин	500 мкг/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цисплатин	165 мкг/мл
Дексаметазон	10 мкг/мл
Доксорубицин	1.16 мкг/мл
лейковорин	2.68 мкг/мл
метотрексат	45 мкг/мл
паклитаксел	3.5 нг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 6, 15, 30 и 60 нг/мл. Средняя концентрация ProGRP была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. ProGRP с добавкой биотина / Средняя конц. ProGRP с добавкой только разбавителя).

Уровень ProGRP	Конц. биотина	Ожид. конц. ProGRP, нг/л	Наблюд. конц. ProGRP, нг/л	Извлечение, %
Низкая	6	133	130	97
Высокая 1	6	561	540	96
Высокая 2	6	996	975	98
Низкая	15	131	117	89
Высокая 1	15	582	542	93
Высокая 2	15	1034	947	92
Низкая	30	136	114	84
Высокая 1	30	601	499	83
Высокая 2	30	1057	900	85
Низкая	60	131	91,2	70
Высокая 1	60	548	365	67
Высокая 2	60	1013	652	64
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 78 нг/мл				

Потенциально влияющие клинические состояния

Для дополнительной оценки специфичности, методом ProGRP EIA были протестированы образцы, содержащие HAMA и ревматоидный фактор (RF). В 6 образцах, содержащих HAMA и в 5 образцах, содержащих RF, был проанализирован % извлечения антигена ProGRP, добавленного в каждый образец в высокой и в низкой концентрациях.

HAMA: В среднем извлечение ProGRP в присутствии HAMA составило 101%, индивидуальные значения лежали в диапазоне 93-111%.

RF: В среднем в образцах, положительных по ревматоидному фактору, извлечение составило 79%. Таким образом, у пациентов с положительным ревматоидным фактором могут быть получены заниженные результаты измерения ProGRP.

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Knigge U, Holst JJ, Knuhtsen S, Petersen B, Krarup T, Holst-Pedersen J, Christiansen PM. Gastrin-releasing peptide: pharmacokinetics and effects on gastro-entero-pancreatic hormones and gastric secretion in normal men. J Clin Endocrinol Metab. 1984;59:310-5
2. Yamaguchi K, Abe K, Kameya T, Adachi I, Taguchi S, Otsubo K, Yanaihara N. Production and molecular size heterogeneity of immunoreactive gastrinreleasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. Cancer Res. 1983 Aug;43(8):3932-9.
3. Holst JJ, Hansen M, Bork E, Schwartz TW. Elevated plasma concentrations of C-flanking gastrin-releasing peptide in small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 1989;7(12):1831-8.
4. Aoyagi K, Miyake Y, Urakami K, Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kodama T, Yamaguchi K. Enzyme immunoassay of immunoreactive progastrin-releasing peptide(31-98) as tumor marker for small-cell lung carcinoma: development and evaluation. Clin Chem. 1995;41(4):537-43.
5. Miyake Y, Kodama T, Yamaguchi K. Pro-gastrin-releasing peptide(31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma. Cancer Res. 1994;54(8):2136-40.
6. Yamaguchi, K., et al., Enzyme-linked immunosorbent assay of pro-gastrinreleasing peptide for small cell lung cancer patients in comparison with neuronspecific enolase measurement. Jpn J Cancer Res, 1995. 86: 698 – 705
7. Stieber P, Dienemann H, Schalborn A, Schmitt UM, Reinmidl J, Hofmann K, Yamaguchi K. Pro gastrin-releasing peptide (ProGRP)—a useful marker in small cell lung carcinoma. Anticancer Res 1999;19: 2673-78
8. Molina R, Filella X, Aug. JM. ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer. Clin Biochem. 2004;37(7):505-11. Review.
9. Molina R, Auge JM, Alicante J, Filella X, Vinolas N, Ballesta AM. Pro-gastrinreleasing peptide in patients with benign and malignant diseases. Tumor Biol. 2004, 25:56-61
10. Stieber P, Yamaguchi K. ProGP enables diagnosis of small-cell lung cancer. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwarz MK. (eds): Tumor markers, Physiology, Pathobiology, technology and Clinical Applications. AACC Press, Washington, 2002, pp 517-521.
11. Niho S, Nishiwaki Y, Goto K, Ohmatsu H, Matsumoto T, Hojo F, Ohe Y, Kakinuma R, Kodama T., Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. Lung Cancer. 2000 Mar;27(3):159-67.
12. Sunaga N, Tsuchiya S, Minato K, Watanabe S, Fueki N, Hoshino H, Makimoto T, Ishihara S, Saito R, Mori M. Serum pro-gastrin-releasing peptide
is a useful marker for treatment monitoring and survival in small-cell lung cancer. Oncology. 1999;57(2):143-8
13. Okusaka T, Eguchi K, Kasai T, Kurata T, Yamamoto N, Ohe Y, Tamura T, Shinkai T, Saijo N. Serum levels of pro-gastrin-releasing peptide for follow-up of patients with small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 1997 Jan;3(1):123-7.
14. Molina, R., ProGRP: A new biomarker for small cell lung cancer. ECJMO 2009, 1(2):25-32.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15. US Department of Labor, Occuptional Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
16. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.
21. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. J Pharmacokinet. 2017; 2(4); 247-256.
22. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. JALM 2018; 2(6); 941-951.
23. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. Clinical Chemistry 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

ProGRP EIA Кат. № 220-10

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

<table>
<tr><th>Шаг</th><th>Флакон/Планшет</th><th>Действия</th></tr>
<tr><td>1. Приготовьте калибраторы ProGRP</td><td>Калибраторы ProGRP
A, B, C, D, E, F</td><td>Добавьте 1,0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон и осторожно перемешайте. Оставьте на 15 минут.
Замечание: точная концентрация каждого калибратора указана на этикетке. Это значение должно использоваться для расчетов.</td></tr>
<tr><td>Приготовьте контроли ProGRP</td><td>Контроли ProGRP
1, 2</td><td>Стабильность после растворения:
3 дня при 2-8° C
3 месяца при -20°C или ниже</td></tr>
<tr><td>2. Приготовьте буфер для промывок</td><td>Концентрат буфера для промывок</td><td>Разбавьте 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды</td></tr>
<tr><td>3. Приготовьте раствор антител</td><td>Трейсер Биотин/анти-ProGRP</td><td>Смешайте 50 мкл трейсера, HRP/анти- ProGRP с 1 мл Биотин анти- ProGRP на каждый стрип.
<table>
<tr><th>Количество стрипов</th><th>Трейсер HRP/анти-ProGRP, (мкл)</th><th>Биотин/анти-HCE, (мл)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr>
<tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr>
<tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr>
<tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr>
<tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr>
<tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr>
<tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr>
<tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr>
<tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr>
<tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr>
<tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>4. Промывка</td><td>Планшет</td><td>Промойте каждую лунку один раз промывочным раствором
Используйте ручной или автоматический вошер</td></tr>
<tr><td>5. Добавьте калибраторы, контроли и образцы</td><td>A, B, C, D, E, F
Контроли ProGRP 1, 2</td><td>50 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>6. Добавьте раствор антител</td><td>Раствор антител</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>7. Инкубация</td><td>Планшет</td><td>2 часа (±10 мин), встряхивая при комнатной температуре (20-30° C)</td></tr>
<tr><td>8. Промывка</td><td>Планшет</td><td>Промойте каждую лунку 6 раз промывочным раствором
Используйте ручной или автоматический вошер</td></tr>
<tr><td>9. Добавьте ТМБ HRP-субстрат</td><td>Субстрат ТМБ</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>10. Инкубация</td><td>Планшет</td><td>30 минут(±5 мин), встряхивая при комнатной температуре (20-30° C)</td></tr>
<tr><td>11. Добавьте стоп-раствор</td><td>Стоп-раствор</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>12. Инкубация</td><td>Планшет</td><td>1 мин, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>13. Считывание оптической плотности</td><td>Планшет</td><td>Считайте при 450 нм в течение 15 минут</td></tr>
</table>

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg Free PSA EIA

Кат. N 350-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 11.2020

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg Free PSA EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg Free PSA EIA предназначен для количественного определения свободного простат-специфического антигена (свободного ПСА) в человеческой сыворотке.

Введение и объяснение метода

Специфический антиген простаты человека представляет собой мономерный гликопротеин с молекулярной массой около 32 кД, сериновую протеазу с химотрипсин подобной специфичностью, продуцируемый секреторным эпителием предстательной железы (1).
ПСА в норме секретируется в семенную жидкость и играет функциональную роль в расщеплении белков семенных пузырьков и разжижении семенного сгустка (2). В кровотоке в норме присутствуют только очень низкие уровни ПСА, и повышение его концентрации в сыворотке свидетельствует о патологии предстательной железы, включая доброкачественную гиперплазию простаты и рак простаты. Определение ПСА в настоящий момент широко используются для выявления и мониторинга пациентов с раком простаты и этот маркер признан лучшим серологическим маркером для рака простаты (3).
Показано, что ПСА образует стабильные комплексы с различными ингибиторами протеаз и большая часть ПСА в сыворотке приходится на комплекс с α1-антихимотрипсином (ПСА-АХТ) (4). Однако существуют большие различия в пропорциях свободного ПСА и ПСА-АХТ комплекса у различных пациентов. Большое количество исследований показали, что доля свободного ПСА выше при доброкачественных заболеваниях предстательной железы, чем при раке простаты (4, 5). Данный набор CanAg Free PSA EIA предназначен для специфического определения свободного ПСА без какой-либо перекрестной реактивности с комплексом ПСА-АХТ (6).

Принцип метода

Настоящий набор CanAg Free PSA EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич”-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

технологии для определения свободного ПСА. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными моноклональными антителами к свободному ПСА и моноклональными антителами к ПСА, меченными пероксидазой хрена (HRP) в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3,5,5-тетраметилбензидин) и проходит ферментная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству свободного ПСА, присутствующему в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 405 нм после добавления стоп-раствора.

Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация свободного ПСА в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg Free PSA EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора проставлен снаружи коробки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов и наборов.
- Храните набор при 2-8ºC.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 плашка	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 микролунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закрыть, хранить сухим.

Калибраторы ПСА 6 флаконов 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

ПСА 0 мкг/л	0.75 мл
ПСА 0.3 мкг/л	0.75 мл
ПСА 1 мкг/л	0.75 мл
ПСА 2 мкг/л	0.75 мл
ПСА 5 мкг/л	0.75 мл
ПСА 10 мкг/л	0.75 мл

Калибраторы находятся в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% метилизотиазолином (МИТ) в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Контроли ПСА (свободного) 2 флакона 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

ПСА (св.) контроль 1	0.75 мл
ПСА (св.) контроль 2	0.75 мл

Контроли находятся в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Готовы для использования.

Биотин Анти -своб.ПСА 1 фл. 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Биотин анти-ПСА моноклональные антитела мыши, ≈ 1.5 мкг/мл.

Фосфатный буфер (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим иммуноглобулином, блокирующими агентами, ТВИН 20, инертным голубым красителем, 0.01% МИТ в качестве консерванта. Готовый к использованию.

HRP- Анти -своб.ПСА Трейсер 1 фл. 0.75 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Сток-раствор пероксидазы хрена анти-ПСА моноклональных антител мыши, ≈ 20 мкг/мл. Должен быть смешан с раствором биотинилированных **Анти -своб.ПСА** антител перед использованием.

HRP-Субстрат ТМБ 1 фл. 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3 ’, 5, 5’ тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

Стоп-раствор 1 фл. 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит 0,12 М раствор соляной кислоты (HCl). Готов к использованию.

Промывочный буфер (x25) 1 фл. 50 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности

Раствор ТМВ HRP-субстрата должен быть бесцветным или слегка голубоватым. Более темное голубое окрашивание свидетельствует о том, что реагент был загрязнен и должен быть утилизирован.

Предупреждения и меры предосторожности

Набор предназначен только для диагностики *in vitro.*

- Только для профессионального использования.
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.
- Обращайтесь с пробами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Соблюдайте местные инструкции по утилизации всех отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предупреждение
Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие заболеваний, передающихся через кровь, обращаться и утилизировать материалы, входящие в состав данного набора необходимо как с потенциально инфекционно опасными материалами.

Сбор и подготовка образцов
Набор CanAg Free PSA EIA предназначен для использования сыворотки. Соберите кровь из вены методом венепункции, отделите сыворотку обычной процедурой. Образцы могут храниться при 2-8ºC в течение 24 часов и 12 месяцев при -20ºC. Для более длительного хранения храните образцы при температуре при -70°C или ниже. Образцы не должны храниться в саморазмораживающихся холодильниках. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем приведите образцы к комнатной температуре перед анализом.
Повышенные уровни свободного ПСА могут ожидаться после манипуляций с простатой. Сбор образцов рекомендуется проводить перед ректальным обследованием. После хирургических процедур с простатой, таких как биопсия или трансуретральная резекция рекомендуется подождать не менее 6 недель перед взятием образцов сыворотки для тестирования свободного ПСА (7). Необходимо учитывать, что терапия ДГП фенастеридом снижает уровень свободного ПСА (7).

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки
1. Шейкер для микропланшета.
Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять от 1 до 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр
с длиной волны 450 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
с одноразовыми пластиковыми наконечниками для раскапывания микрообъемов жидкостей (микролитры и миллилитры). 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна..
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
Для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа
1. Для получения точных результатов при использовании набора CanAg Free PSA EIA важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºC. Замороженные образцы после оттаивания должны быть аккуратно, но тщательно перемешаны.
3. Перед раскапыванием калибраторов, контролей и образцов сывороток пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов твердофазное антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
Автоматическая промывка (с использованием вошера): Следуйте инструкциям производителя прибора по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться, что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
5. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к контаминации. Для получения оптимальной стабильности TMB HRP-субстрата перенесите необходимое количество из флакона в тщательно вымытый сосуд или предпочтительно одноразовый пластиковую емкость для предотвращения загрязнения реагента. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники (или наконечники для диспенсеров).
6. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники и соблюдаете правильную технику пипетирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте прикосновения к стрипу или поверхности жидкости и переноса реагента из лунки в лунку. Это особенно важно при работе с HRP-субстратом ТМБ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление реагентов	Стабильность
Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºС в герметичном контейнере

Налейте 50 мл промывочного концентрата в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Раствор антител 3 недели при 2-8ºС

Приготовьте нужный объем раствора антител смешением 50 мкл трейсера, HRP-антител к свободному ПСА, с 1 мл биотинилированных антител к свободному ПСА на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера, HRP-анти св. ПСА (мкл)	Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления раствора антител.

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с трейсером, HRP-антителами к свободному ПСА во флакон с биотинилированными антителами к свободному ПСА и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера перенесен во флакон с биотинилированными антителами к свободному ПСА.

Замечание: Раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºС. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

Процедура анализа

Проводите каждое измерение калибраторов, контролей и проб пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть приведены к комнатной температуре (20-25ºС).

1. Начните с приготовления буфера для промывок и раствора антител. Очень важно использовать чистые контейнеры. Тщательно следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. Поместите неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте по 50 мкл калибраторов ПСА (Кал. 0, 0.3, 1, 2, 5, 10), контролей (к) и образцов сывороток пациентов (обр) в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	Кал. 0	Кал. 5	обр. 1		
B	Кал. 0	Кал. 5	обр. 1		
C	Кал. 0.3	Кал. 10	обр. 2		
D	Кал. 0.3	Кал. 10	обр. 2		
E	Кал. 1	к.1	и т. д.		
F	Кал. 1	к.1			
G	Кал. 2	к. 2			
H	Кал. 2	к. 2			

4. Добавьте по 100 мкл раствора антител в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкости, удерживая наконечники чуть выше верхнего края лунок при дозировании, и избегайте касания наконечниками стрипов или поверхности жидкости.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 10 минут) при комнатной температуре (20-25ºС) с постоянным перемешиванием плашки на шейкере для микропланшет.
6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п.4.”Замечаний по процедуре анализа”.
7. Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл TMB HRP-субстрата, в той же последовательности, как в шаге 4. Раствор TMB HRP-субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю ячейку не превышало 5 минут.
8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 30 минут (± 5 мин.) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 450 нм.

Диапазон измеряемых значений

Набор CanAg Free PSA EIA предназначен для измерения в диапазоне концентраций 0.03 – 10 мкг/л. Если концентрация свободного ПСА в образце превышает данный диапазон, необходимо развести его нормальной человеческой сывороткой перед анализом. ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотку, используемую для разведения, также необходимо проанализировать вместе с образцом, для определения уровня эндогенного свободного ПСА (см. «Расчет результатов»).

Контроль качества

Контрольные сыворотки свободного ПСА, поставляемые с набором, уровни 1 и 2, могут быть использованы для оценки достоверности результатов анализа. Диапазоны допустимых значений, специфичный для контрольных сывороток, указаны на этикетках флаконов. Если получаемые для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

контрольных сывороток значения не попадают в диапазон допустимых значений, необходимо провести полную проверку реагентов и оборудования и повторить анализ.
Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референсные материалы.
I Международный стандарт 96/668 может быть использован в качестве референсного стандарта.
Значения калибраторов свободного ПСА или контролей, поставляемых с набором, были получены по набору внутренних стандартов, прокалиброванных по I Международному стандарту.

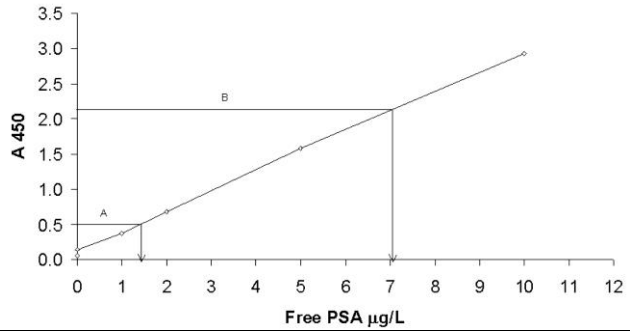
Расчет результатов
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора свободного ПСА, указанную на флаконах.
Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в стандартную кривую со значением 0 мкг/л.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого калибратора против соответствующих концентраций свободного ПСА (в мкг/л) (см. рисунок ниже). Значения концентраций свободного ПСА в образцах для каждого пациента находятся из калибровочной кривой.

Пример результатов



Образец	Значения	Средняя ОП	Свободный
	калибраторов	(А)	ПСА, мкг/л
Калибратор 0	0 мкг/л	0.054	
Калибратор 0.3	0.3 мкг/л	0.148	
Калибратор 1	1 мкг/л	0.369	
Калибратор 2	2 мкг/л	0.683	
Калибратор 5	5 мкг/л	1.580	
Калибратор 10	10 мкг/л	2.930	
Образец А		0.522	1.480
Образец В		2.181	7.147

Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Расчет результатов с разбавлением образцов
Если образец дает значение свободного ПСА больше 10 мкг/л, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 нормальной сывороткой и проанализировать повторно для получения точной концентрации свободного ПСА. Замечание: В образце, используемом для разведения, также необходимо определить уровень свободного ПСА, для определения эндогенной концентрации.
В этом случае концентрация свободного ПСА в исходном образце рассчитывается следующим образом:

Разведение 1/10:
$10 \times ([\text{свободного ПСА}]_{\text{разводимого образца}} - (0.9 \times [\text{свободного ПСА}]_{\text{нормальной мужской сыворотки}}))$

Ограничения метода
Уровни свободного ПСА не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор свободного ПСА не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний и тестирование свободного ПСА не должно замещать другие клинические исследования.
Калибраторы своб. ПСА данного набора не следует использовать для изучения извлечения свободного ПСА. Для этого следует использовать сильно повышенные значения образцов пациентов.
Антитела к реагентам (человеческие анти-мышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), которые могут присутствовать в образцах сывороток пациентов, могут иногда влиять на результаты анализа, не смотря на то, что в буфер добавлены блокирующие агенты.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (10, 11). В исследовании Grimsey и др. (10) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (12).

Ожидаемые значения

Измерения свободного ПСА могут быть использованы совместно с эквимолярным определением общего ПСА, таким, как например, CanAg Free PSA EIA (340-10) для получения пропорции свободный ПСА/общий ПСА.

С помощью наборов CanAg PSA EIA и CanAg Free PSA EIA были проанализированы образцы сывороток 52 мужчин и объективно установленным диагнозом доброкачественная гиперплазия простаты (ДГП) и 77 мужчин с раком простаты (РП):

Диагноз (n)	Свободный ПСА/общий ПСА				
	медиана	Min.	Max.	среднее	(95% доверительный интервал)
ДГП (52)	0.18	0.04	0.42	0.19	(0.17–0.21)
РП (77)	0.09	0.02	0.53	0.12	(0.10–0.14)

Выбор уровня cut-off, используемого в клинической практике, зависит от конкретного клинического применения, например, необходимо ли оптимизировать чувствительность либо специфичность. Чувствительности (% правильно определенных РП) и специфичности (% правильно определенных ДГП) для различных уровней cut-off для отношения Свободный ПСА/общий ПСА приведены ниже:

Свободный ПСА/общий ПСА cut-off	Клиническая специфичность (ДГП > cut-off)			Клиническая чувствительность (РП < cut-off)		
	n	%	95% доверительный интервал	n	%	95% доверительный интервал
0.23	14 (52)	27	(16–41)	69 (77)	90	(81–95)
0.16	36 (52)	69	(55–81)	64 (77)	83	(73–91)
0.08	48 (52)	92	(81-98)	30 (77)	39	(28-51)

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила применимость приведенных выше ожидаемых значений для собственной популяции и выполняемого метода (7).

Характеристики метода

Точность

Общая точность была рассчитана согласно руководству NCCLS EP5-A (15), с использованием четырех уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленный Свободный ПСА при 6 различных комбинациях реагентов набора CanAg Free PSA EIA. Каждый образец был случайным образом пипетирован (n=2/анализ) и протестирован дважды в день в течение 20 дней.

образец	реплики	среднее (мкг/л)	SD внутри серии (мкг/л)	CV внутри серии, %	SD между сутками (мкг/л)	CV между сутками %
Free PSA 1	80	0.38	0.01	1.9	0.01	3.0
Free PSA 2	80	1.44	0.02	1.6	0.04	2.6
Free PSA 3	80	3.46	0.05	1.6	0.08	2.3
Free PSA 4	80	6.91	0.09	1.3	0.12	1.8

Предел обнаружения

Предел обнаружения для набора CanAg Free PSA EIA составил < 0.03 мкг/л и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения (n=24) и подсчитан по формуле:

$$\frac{2x\ SD\ Калибратор\ 0}{OD\ Калибратор\ 0.3 - OD\ Калибратор\ 0} \times 0.3\ мкг/л$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки были приготовлены добавлением аликвот образцов с сильно повышенным значением ПСА к нормальным образцам сывороток мужчин. % извлечения антигена составил ±15% ожидаемого значения.

Замечание: Не следует использовать наборы калибраторов для определения извлечения.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями > 5000 мкг/л.

Линейность

Образцы сывороток пациентов были разбавлены нормальными образцами сывороток мужчин и проанализированы. Полученные значения составили ± 10% от ожидаемых значений свободного ПСА.

Аналитическая специфичность:

CanAg Free PSA EIA основывается на двух различных типах мышиных моноклональных антител, антитела PSA30 и антитела PSA66, направленных на два эпитопа свободного ПСА (6).

Перекрестная реактивность

Моноклональные антитела PSA30 и PSA66 демонстрируют <1% перекрестной реактивности с комплексом ПСА-АХТ и отсутствие перекрестной реактивности с человеческим kallikrein 2 (13). При различных пропорциях ПСА_АХТ и свободного ПСА, используемых при исследовании с набором CanAg Free PSA EIA, уровень перекрестной реактивности определен как 2%.

Интерферирующие вещества

Были протестированы следующие вещества в указанных концентрациях и не обнаружена интерференция с ними:

	Концентрация с незначительной (±10%) интерференцией
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин, несвязанный	0.4 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 6, 15, 30 и 60 нг/мл. Средняя концентрация свободного ПСА была определена для каждого образца, и процент извлечения для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. Свободного ПСА с добавкой биотина / Средняя конц. Свободного ПСА с добавкой только разбавителя).

Уровень свободного ПСА	Конц. Биотина, нг/мл	Ожидаемая конц. свободного ПСА, µг/л	Наблюдаемая конц. свободного ПСА, µг/л	Извлечение, %
Низкая	6	0,82	0,82	100
Высокая	6	8,47	8,55	101
Низкая	15	0,82	0,82	100
Высокая	15	8,61	8,55	99
Низкая	30	0,81	0,71	88
Высокая	30	8,26	6,93	84
Низкая	60	0,81	0,55	68
Высокая	60	8,30	4,96	60
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 24 нг/мл				

Сравнение методов

Тест-система CanAg Free PSA EIA (номер по каталогу 350-10) сравнивалась с двушаговой тест-системой CanAg Free PSA EIA (330-10). Набор использовался для анализа Значения 127 сывороток мужчин находились в диапазоне 0-9 мкг/л, а линейный регрессионный анализ дал следующие результаты:

$$[\text{свободный ПСА}]_{\text{кат. номер 350-10}} = 1.02 \times [\text{свободный ПСА}]_{\text{кат. номер 330-10}} - 0.06 \qquad r = 0.99$$

Гарантии

Характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159–163.
2. Lilja H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76: 1899–1903.
3. Haese A., Becker C., Diamandis E., and Lilja H., (2002) Adenocarcinoma of the Prostate In: „Tumor Markers. Phusiology, Pathobiology, Technology, and Clinical applications". Eds. Diamandis et al., AACC Press, Washington, pp. 193-238.
4. Lilja H., Christensson A., Dahlén U., Matikainen M-T., Nilsson O., Pettersson K., Lövgren T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α_1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 37: 1618–1625.
5. Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen M-T., Cockett ATK, Abrahamsson PA, Lilja H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to α_1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urology* 150: 100–105.
6. Nilsson O., Peter A. Andersson I., Nilsson K., Grundström B., and Karlsson B. Antigenic determinants of prostatespecific antigen (PSA) and development of assays specific for different forms of PSA. *Br J Cancer* 75(6):789–797, 1997.
7. Price C. P., Allard J., Davies G., Dawnay A., J Duffy M., France M., Mandarino G., Milford Ward A., Patel B., Sibley P. and Sturgeon C. (2001) Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem*; 38: 188–216.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
10. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
11. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
12. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.
13. ISOBM TD-3 International Workshop on Monoclonal Antibodies against Prostate-Specific Antigen. *Tumor Biology*, 1999; 20 (suppl. 1): 1-94.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg Free PSA EIA Кат. N 350-10

Смешивайте компоненты прямо перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/Плашка	Действия
1. Приготовить буфер для промывок	WASHBUF 25X	Разбавить 50 мл концентрата буфера для промывок 1200 мл дистиллированной воды или деионизированной воды
Приготовить раствор антител	CONJ Anti-FPSA BIOTIN Anti-FPSA	Смешать 50 мкл трейсера, HPR- анти-своб.ПСА с 1 мл биотинилированных антител к свободному ПСА на каждый стрип: Кол-во стрипов / Трейсер, мкл / Биотинилированные антитела к свободному ПСА, 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
2. Промывка	MICROPLA	Промыть каждую ячейку один раз буфером для промывок
3. Добавить калибраторы, контроли и образцы	CAL PSA 0, 0.3, 1, 2, 5, 10 CONTROL FPSA 1, 2	50 мкл в каждую ячейку
4. Добавить раствор антител	**Рабочий раствор антител**	100 мкл в каждую ячейку
5. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре
6. Промывка	MICROPLA	Промыть каждую ячейку 6 раз промывочным раствором
7. Добавление ТМБ HRP-субстрата	SUBS TMB	100 мкл в каждую ячейку
8. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
9. Добавить стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую ячейку
10. Инкубация	MICROPLA	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
11. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считать при 450 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg **CA125 EIA**

Кат. N 400-10

IVD CE

Инструкция по применению. Версия 02.2020

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg **CA125 EIA**

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg CA125 EIA предназначен для количественного определения опухолевого антигена CA125 в сыворотке.

Введение и объяснение метода

CA125 – высокомолекулярный гликопротеин муцинового типа, первоначально выявленный с помощью моноклональных антител (MAb) Oc125 Bast et al. (1). Определенные эпитопы, экспрессирующиеся совместно с эпитопом Oc125 на антигене CA125, были использованы для разработки гетерологичных методов определения антигена CA125 (2).
Набор CanAg CA-125 EIA использует два мышиных моноклональных антитела: Ov197 и Ov185, против двух различных независимых эпитопов к белковой сердцевинной части антигена CA125 (3, 4).
Определение CA125 часто используется для мониторинга пациенток с онкогинекологическим заболеваниями, такими как эпителиальный рак яичников (5).

Принцип метода

Настоящий набор CanAg CA125 EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич” технологии. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируют вместе с биотинилированными анти-CA125 моноклональными антителами Ov197 (полученными из мыши) в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. В процессе инкубации CA125, содержащийся в калибраторах, контролях или образцах пациентов, адсорбируется на покрытых стрептавидином лунках микропланшета, связываясь с биотинилированными анти-CA125 моноклональными антителами. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена, меченой анти-CA125 моноклональными антителами Ov185. После промывки в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствие антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена CA125 в образце.
Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре с фильтром 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация CA125 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реагенты

- Каждый набор CanAg CA125 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживать!
- Сроки хранения вскрытых реагентов при условии, что реагенты не были контаминированы, хранились в плотно закрытых оригинальных упаковках и использовались так, как описано в данной инструкции, указаны в таблице. Верните оставшиеся реагенты в холодильник на 2-8°C сразу после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 планшет	2-8ºC до истечения срока годности
12 разделяемых стрипов по 8 лунок (12x8), покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закройте пакет и храните сухим.		
Калибраторы CA125	5 флаконов	2-8ºC до истечения срока годности
CA125 0 Ед/л 8 мл CA125 10 Ед/л 0.75 мл CA125 40 Ед/л 0.75 мл CA125 200 Ед/л 0.75 мл CA125 500 Ед/л 0.75 мл		
Антиген CA19-9 находится в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.05% азидом натрия в качестве консерванта Готовы к использованию. Калибратор CA19-9 0 должен также использоваться для разведения образцов.		
Контроли CA125	2 флакона	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
CA125 контроль 1 0.75 мл CA125 контроль 2 0.75 мл		
Антиген CA125 находится в солевом растворе Трис-HCl буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.05 % азида натрия в качестве консерванта. Готовы к использованию.		
Биотинилированные Анти -CA125	1 фл. 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности , указанного на флаконах
Биотин анти-CA125 моноклональные антитела мыши, ≈ 2 мкг/мл. Солевой раствор Трис-HCl буфера (pH 7.75) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, инертным красным красителем, 0.05% азидом натрия в качестве консерванта. Готовы к использованию.		
Трейсер , HRP-анти CA125	1 фл. 0.75 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
Сток-раствор пероксидазы хрена и анти-CA125 моноклональных антител мыши, ≈ 30 мкг/мл. Содержит консерванты. Должен быть разбавлен перед использованием разбавителем трейсера.		
Разбавитель трейсера	1 фл. 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
Готовый к использованию солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, детергентами, инертным голубым красителем и 0.01% МИТ в качестве консерванта.		
HRP-Субстрат ТМБ	1 фл. 12 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3 ', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ)..		
Стоп-раствор	1 фл. 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности
Готовая к использованию 0.12 М соляная кислота.		
Концентрат 25x буфера для промывок	1 фл. 50 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на бутылке
Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой. Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с Tween 20 и Germall II в качестве консерванта.		

Показатели нестабильности

Раствор HRP-субстрата TMB должен быть бесцветный или слегка голубоватый. Голубой цвет свидетельствует о загрязнении реагента и раствор должен быть утилизирован.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики *in vitro*.

• Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.

• Обращайтесь с пробами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.

• Реагенты содержат азид натрия (NaN3) в качестве консерванта. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью в канализационной системе с образованием взрывоопасных азидов металлов. При утилизации смывайте большим количеством воды.

• Следуйте принятым инструкциям при утилизации всех отработанных материалов.

Предосторожности:

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствия инфекционных заболеваний, передающихся с кровью, то со всеми биологическими материалами необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Сбор и подготовка образцов

Набор CanAg CA125 EIA предназначен для использования сыворотки. Соберите кровь из вены, и отделите сыворотку с помощью обычных процедур. Образцы могут храниться при 2-8ºC до 24 часов. Для более длительного хранения образцов рекомендуется -70ºC или более низкая температура. Нельзя хранить образцы в самораз мораживающемся морозильнике. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Шейкер для микропланшетов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Встряхивание должно быть от среднего до энергичного, приблизительно 700-1100 колебаний/мин.

2. Микропланшетный вошер.
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1, 3 или 6 циклов промывки с минимальным объемом 350 мкл/лунку/цикл промывки.
   Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр

с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания от 0 до 3.0.

4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей, 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл желательна, но не обязательна. Пипетки для внесения объемов в миллилитрах.
5. Дистиллированная или деионизированная вода для приготовления промывочного буфера.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору CanAg CA125 EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºC. Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны.
3. Перед внесением калибраторов и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.

4. Требование эффективной и тщательной промывки для отделения связанного и несвязанного антигена и реагентов от комплексов твердофазное антитело-антиген является одним из наиболее важных этапов при проведении анализа ИФА. Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что все лунки полностью заполнены до верхнего края промывочным раствором во время каждого цикла промывки, этот промывочный раствор вносится с хорошим потоком, а также аспирация лунок между и после циклов промывки завершена и лунки пусты. Если в лунках осталась часть жидкости, переверните планшет на фильтровальную бумагу и легко постучите по рамке планшета.
Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора по тщательной очистке и уходу и промывайте с необходимым количеством циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендуется использовать режим промывки стрип и режим промывки с переливом при объеме дозирования 800 мкл. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться, что приведет к плохому дозированию и аспирации жидкости.

5. Раствор HPR-субстрата TMB очень чувствителен к контаминации. Для оптимальной стабильности HPR-субстрата ТМБ убедитесь в том, что вы используете чистый сосуд или предпочтительно одноразовый пластиковый флакон и чистые одноразовые пластиковые наконечники для предотвращения загрязнения реагента. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).

6. Убедитесь, что Вы используете только чистые одноразовые наконечники для пипеток и правильную технику пипетирования во время дозирования образцов и реагентов. Чтобы избежать переноса жидкости, не касайтесь наконечником пипетки поверхности стрипов и жидкости, для чего держите пипетку немного выше верхнего края лунки. Правильная техника дозирования имеет особое значение при внесении образцов и раствора TMB HPR-субстрата.

Приготовление реагентов	**Стабильность приготовленного реагента**
Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºC в герметичном контейнере

Налейте 50 мл промывочного концентрата в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Рабочий раствор трейсера 3 недели при 2-8ºC в герметичном контейнере

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера смешением 50 мкл раствора трейсера, HRP Anti-CA125 с 1 мл разбавителя трейсера на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера (мкл)	Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с раствором трейсера, HRP Anti-CA125 во флакон с разбавителем трейсера и осторожно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера, HRP Anti-CA125 перенесен во флакон с разбавителем трейсера.
Замечание: Рабочий раствор трейсера стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºC. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА
Измерения калибраторов, контролей и проб пациентов рекомендуется проводить в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Все реагенты и образцы должны иметь комнатную температуру перед анализом (20-25ºC).
1. Начните с приготовления буфера для промывок и рабочего раствора трейсера. Очень важно использовать только чистые контейнеры. Тщательно соблюдайте данную инструкцию.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. (Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно закройте его.) Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
2. Добавьте 25 мкл калибраторов CA125 (кал. 0, 10, 40, 200, 500), контролей (к) и образцов пациентов (обр.) в лунки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал.0	кал.500	обр. 2		
B	кал.0	кал.500	обр. 2		
C	кал.10	К. 1	и т. д.		
D	кал.10	К. 1			
E	кал.40	К. 2			
F	кал.40	К. 2			
G	кал.200	обр. 1			
H	кал.200	обр. 1			

4. Добавьте 100 мкл раствора биотинилированных анти-CA125 в каждую лунку, используя высокоточную пипетку на 100 мкл (или восьмиканальную высокоточную пипетку).. Избегайте соприкосновения наконечников пипетки со стрипом или поверхностью жидкости и переноса реагента из лунки в лунку.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 10 минут) при комнатной температуре (20-28ºC) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшетов.
6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 ”Замечаний по процедуре анализа”.
7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора трейсера в той же последовательности, как в шаге 4.
8. Инкубируйте держатель со стрипами в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-25ºC) с постоянным шейкированием.
9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п.4 “Замечаний по процедуре анализа”.
10. Добавьте 100 мкл HRP-субстрата ТМБ в каждую лунку, в той же последовательности, как в п.4. Раствор HRP-субстрата ТМБ следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным шейкированием планшета. Избегайте попадания прямого солнечного света.
12. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант
Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в альтернативном шаге 12.
12 альт. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений
Диапазон измерения данного набора CanAg CA125 EIA составляет 1.5 до 500 Ед/л. Если концентрация CA125 в образце превышает измеряемый диапазон, образец необходимо развести калибратором «0» и перед анализом.

Контроль качества
Для контроля качества измерений могут быть использованы контроли CA125 1 и 2, поставляемые в наборе. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля. Если полученные значения не попадают в указанные диапазоны, необходимо полностью проверить все реагенты и оборудование, и повторить тестирование. Каждой лаборатории рекомендуется приготовить свои собственные пулы сывороток с различными уровнями, которые можно использовать для внутреннего контроля качества исследований.

Референсные материалы
Так как не существует международного референсного стандарта для антигена CA125, значения калибраторов данного набора CanAg CA125 EIA были установлены по набору внутренних стандартов производителя.

Расчет результатов
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию, указанную на этикетке к каждому калибратору CA125.
Для автоматического расчета результатов CA125 рекомендуется использовать следующие методы:
- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 Ед/л.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен быть использован как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 Ед/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 Ед/л.

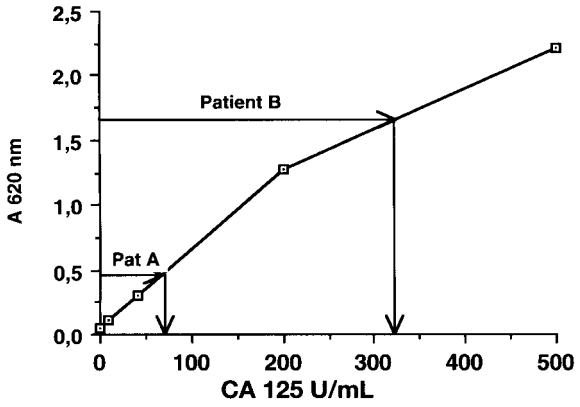
Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого калибратора против соответствующих концентраций CA125 (в Ед/л) (см. рисунок ниже). Значения концентраций CA125 в образцах для каждого пациента находят по калибровочной кривой, используя оптическую плотность образца.

Если в образце уровень CA125 больше 500 Ед/л, необходимо разбавить его в 10 или 100 раз нулевым калибраторов для получения точных результатов концентрации.
Разбавление в 10 раз = 50 мкл образца + 450 мкл калибратора CA125 0
Разбавление в 100 раз = 50 мкл разбавленного в 10 раз образца + 450 мкл калибратора CA125 0
Концентрация CA125 в неразбавленных образцах рассчитывается следующим образом:
Разбавление в 10 раз: 10 х Полученное значение
Разбавление в 100 раз: 100 х Полученное значение

Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Образец	Значения калибраторов	Значения поглощения (А)	CA125 Ед/л
Калибратор 0	0 Ед/л	0.047	
Калибратор 10	10 Ед/л	0.116	
Калибратор 40	40 Ед/л	0.298	
Калибратор 200	200 Ед/л	1.269	
Калибратор 500	500 Ед/л	2.218	
Образец А		0.490	69.8
Образец В		1.650	325



Пример (не используйте данную кривую для определения результатов реального анализа)

Ограничения метода

Уровни CA125 не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, и набор CA125 не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты анализа должны интерпретироваться только в совокупности с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний, и CA125-тест не должен заменять другие клинические исследования.
Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела) в образцах сывороток пациентов могут иногда влиять на результаты анализа, несмотря на то, что в буфер добавлены специфические блокирующие агенты.
На результаты анализа может влиять биотин, давая ложные низкие результаты. Это необходимо учитывать при тестировании образцов сывороток больных, получающих биологические добавки или терапию с высоким (> 5 мг в день) или очень высоким (300 мг в день) содержанием биотина. Максимальный уровень в сыворотке наблюдается через 1-3 часа после приёма, период полувыведения составляет приблизительно 8-16 часов, в зависимости от функции почек (9,10). В исследовании авторов Grimsey et al. (9) показано, что концентрация биотина в образце достигла 30 нг/мл через 8 часов после приёма 10 мг биотина. Больным, получающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить приём биотина не менее, чем за 2 дня перед взятием крови (11).

Ожидаемые значения

Данным набором CanAg CA125 были проанализированы образцы сывороток, взятые у 100 здоровых женщин – доноров крови. Было получено среднее значение 14.7 Ед/л, со стандартным отклонением 7.7. Медиана составила 13.1 Ед/л, диапазон 5.06– 47.9 Ед/л. Нижний и верхний пределы нормального диапазона определяли с использованием рекомендованной IFCC непараметрической статистической обработки. Референсный интервал включает 95% фракцию референсного распределения. Референсные пределы, соответственно, могут быть установлены как 2.5% (нижний) и 97.5% (верхний) квантили. Эти пределы отсекают по 2.5% фракции значений от каждого «конца» референсного распределения. Непараметрический метод дал следующие результаты:

N=100

фракция	Референсный предел (Ед/л)
2.5% (нижний)	5
97.5% (верхний)	39

У 96% здоровых женщин полученные значения были ниже 35 Ед/мл.
Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, подборка пациентов и т. д.
Также необходимо всегда помнить, что индивидуальные собственные базовые уровни

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пациентов всегда предоставляют наиболее важную информацию для интерпретации результатов измерения сывороточного маркера (6).

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Точность

Общая точность была рассчитана согласно руководству NCCLS EP5-A (7), с использованием 4 уровней замороженной пулированной сыворотки, содержащей добавленный пул асцитной жидкости, Каждый образец пипетировался случайным образом (n=2 в постановке) и анализировался 2 раза в день в течение 10 дней. Анализ проводили на протяжении 8 месяцев двумя и более операторами и с использованием 10 разных лотов набора CanAg CA125 EIA.

образец	повторы	Среднее, Ед/л	SD внутри серии, Ед/л	CV внутри серии, %	SD между сутками, Ед/л	CV между сутками, %
CA125 1	40	16.8	0.74	4.4	0.53	3.1
CA125 2	40	75.7	3.26	4.3	2.42	3.2
CA125 3	40	201	8.55	4.3	7.58	3.8
CA125 4	40	392	11.4	2.9	15.5	4.0

Предел обнаружения (чувствительность)

Предел обнаружения для данного набора составил < 1.5 Ед/мл и определен как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения, и рассчитан по формуле:

$$\frac{2 \times SD\ CAL\ 0}{OD\ CAL\ 10 - OD\ CAL\ 0} \times 10\ Ед/л$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки были приготовлены добавлением антигена CA125 к нормальным образцам сыворотки. Извлечение антигена было найдено в диапазоне 100 ±15%.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 50 000 Ед/мл.

Замечание: в пробах с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый (и даже желтый при очень высоких концентрациях). Это приводит к ложно низкой оптической плотности при 620 нм, и в экстремальных случаях оптическая плотность может снижаться до значений в пределах диапазона измерения калибровочной кривой, что может считаться Хук-эффектом.

Линейность

Пробы сывороток пациентов были последовательно разведены калибратором «0» и проанализированы. Полученные значения были в пределах 100 ±15%.

Специфичность

Данный набор CanAg CA125 EIA основан на использовании двух типов мышиных моноклональных антител, Ov197 и Ov185, против двух различных эпитопов к сердцевинной белковой части CA125. Определение возможной интерференции выполнялось согласно руководству EP7-P NCCLS (8). Для оценки возможной интерференции были протестированы следующие вещества в указанных концентрациях и показано отсутствие влияния на результаты анализа:

	Концентрация, не оказывающая значительного (± 10%) влияния
Липемия (Intralipid®)	4 мг/мл
Билирубин, неконъюгированный	0.6 мг/мл
гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином

Для оценки интерференции биотина было выполнено специальное исследование. Образцы контрольных сывороток с низкими, средними и высокими концентрациями аналита были обогащены до конечной концентрации биотина 15, 30, 60 и 200 нг/мл. Для каждого образца определяли среднюю концентрацию CA125 и рассчитывали процент извлечения для каждой концентрации биотина, по формуле:

Извлечение (%) = 100 x (средняя концентрация CA125 в образце, обогащённом биотином/ средняя концентрация CA125 в образце при добавлении только буфера).

Уровень CA125	Конц. (нг/мл) биотина	Ожидаемая конц. CA125 (Ед/мл)	Полученная конц. CA125 (Ед/мл)	Извлечение (%)
низкая	15	112,1	110,8	99
средняя	15	408	410,6	101
высокая	15	27,6	26,6	96
низкая	30	112,1	110,1	98
средняя	30	408	414	101
высокая	30	27,6	26,3	95
низкая	60	112,1	106,3	95
средняя	60	408	419,3	103
высокая	60	27,8	17	61
низкая	200	112,4	65,9	59
средняя	200	411,5	301,5	73
высокая	200	112,1	110,8	99

На основе линейного регрессионного анализа выявлено, что наименьшая концентрация биотина, влияющая на результат тестирования (≥10%), составляет 76 нг/мл.

Гарантии

Характеристики набора, представленные выше, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Литература:

1. Bast R., Feeney M., Lazarus H., Nadler L., Colvin R., Knapp R., (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 68: 1331 - 1337.
2. O'Brien T, Raymond L, Bannon G, Ford D, Hardardottir H, Miller F, Quirk J (1991). New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA125 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1857 - 1864.
3. Nilsson O, Jansson E-L, Dahlen U, Nilsson K, Nustad K, Högberg T, Lindholm L (1994). In: Current Tumor Diagnosis: Applications, Clinical Relevance, Research, Trends. Ed R. Klapdor. Zuckswerdt Verlag München, pp 401-405.
4. Nustad K. et al., (1996) Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA125 antigen: First report from the ISOBM TD-1 Workshop. *Tumor Biol* 17:196-219.
5. Bonfrer J., Duffy M., Radtke, M., Segurado O., Torre G., van Dalen A., Zwirner M. (1999) Tumor markers in gynaecological cancers-EGTM recommendations. *Anticancer Research* 19:2785-2820.
6. Tuxen M., Sölétormos, G., Rustin, G., Nelstrop A., Dombernowsky, P. (2000) Biological variation and analytical imprecision of CA125 in patients with ovarian cancer. *Scand J Clin Invest* 60:713-722.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
9. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
10. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
11. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO®
Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Протокол

CanAg CA125 EIA

Кат. N 400-10

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/ Планшет	Действия
1. Приготовить промывочный раствор	Концентрат промывочного раствора	Разбавить 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной воды
Приготовить рабочий раствор трейсера	Трейсер Разбавитель трейсера	Смешать 50 мкл трейсера, HRP-анти-CA125 с 1 мл разбавителя трейсера на стрип,: № стрипа — Трейсер, HRP-анти-CA125. мкл — Разбавитель 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
2. Промывка	Планшет	Промыть каждую лунку один раз промывочным раствором Используйте ручной или автоматический вошер.
3. Добавить калибраторы, контроли и образцы	Калибраторы 0, 10, 40, 200, 500, образцы	25 мкл в каждую лунку
4. Добавить биотинилированные анти-CA125	Биотин анти CA125	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	Планшет	2 часа, встряхивая при комнатной температуре
6. Промывка	Планшет	Промыть каждую лунку 3 раза промывочным раствором Используйте ручной или автоматический вошер.
7. Добавить рабочий раствор трейсера	Рабочий раствор трейсера	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	Планшет	1 час, встряхивая при комнатной температуре
9. Промывка	Планшет	Промыть каждую лунку 6 раз промывочным раствором Используйте ручной или автоматический вошер.
10. Добавление ТМБ HRP-субстрата	Субстрат ТМБ	100 мкл в каждую лунку
11. Инкубация	Планшет	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
12. Считывание оптической плотности	Планшет	620 нм
12a. Добавить стоп-раствор	Стоп-раствор	100 мкл в каждую лунку
13a. Инкубация	Планшет	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
14a. Считывание оптической плотности	Планшет	Считать при 405 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg CEA EIA

Кат. N 401-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
	Температурный режим
	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg CEA EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg CEA EIA предназначен для количественного определения раково-эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке.

Введение и объяснение метода

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) - гликопротеин, который вначале был идентифицирован у пациентов с карциномой прямой кишки и эпителиальным раком эндодермального происхождения (гастроинтестинальный тракт) Gold и Freedman (1). Молекула РЭА имеет достаточно гетерогенный состав благодаря углеводам (до 50-60%) и в зависимости от метода выделения. Она растворима в перхлорной кислоте и имеет молекулярную массу 175.000-200.000 Дальтон (2).

Иммунологическое и генетическое определение РЭА позволило открыть РЭА-подобные молекулы с общими антигенными детерминантами, синтезируемые нормальными и патологическими тканями. Из них наиболее значим NCA (неспецифический перекрёстный антиген), синтезируемый нормальными и патологическими тканями. Проблему перекрестных реакций РЭА-подобных молекул в анализе РЭА можно преодолеть использованием моноклональных антител. Данный набор CanAg CEA EIA использует пару моноклональных мышиных антител к Gold-эпитопам IV и V (3, 4).

РЭА секретируется в высоких концентрациях опухолевыми клетками и широко используется как серологический маркер гастроинтестинальных карцином, рака легких и рака груди. В случаях гастроинтестинальных карцином общепризнано использование теста РЭА для контроля ответа на терапию и для подтверждения прогрессии заболевания (5, 6). РЭА может также обнаруживаться при доброкачественных воспалительных гастроинтестинальных заболеваниях или при заболеваниях гепатобилиарной сферы. В этих исследованиях подчёркивается, что РЭА не может использоваться в качестве скринингового теста обнаружения рака.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Принцип метода

Настоящий набор CanAg CEA EIA является твердофазным, неконкурентным иммуноферментным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич”-технологии. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-РЭА моноклональными антителами и фермент-мечеными анти-РЭА моноклональными антителами в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. После инкубации стрипы промываются. Далее в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3,5,5-тетраметилбензидин), с участием которого осуществляется ферментная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству РЭА в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм (или возможно при 405 нм после добавления стоп-раствора). Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация РЭА в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg CEA EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов и наборов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и хранятся и используются как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 планшет	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы РЭА	6 флаконов	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
РЭА 0 µг/л	1x8 мл	
РЭА 2 µг/л	1x 0.75 мл	
РЭА 5 µг/л	1x 0.75 мл	
РЭА 15 µг/л	1x 0.75 мл	
РЭА 50 µг/л	1x 0.75 мл	
РЭА 75 µг/л	1x 0.75 мл	

Калибраторы РЭА находятся в растворе Трис-HCl солевого буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и 0.01% метилизотиазолоном (МИТ) в качестве консерванта. Готовы для использования. Калибратор 0 µг/л также может быть использован для разведения образцов.

Контроли РЭА	2 флакона	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах
РЭА контроль 1	1 x 0.75 мл	
РЭА контроль 2	1 x 0.75 мл	

Содержат РЭА в растворе Трис-HCl солевого буфера с бычьим сывороточным альбумином и 0.01 % МИТ в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Биотинилированные анти -РЭА	1 x 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Биотин анти-РЭА моноклональные мышиные антитела ≈ 3 µг/мл. Содержит фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, бычьим иммуноглобулином, Tween 20, инертным голубым красителем, и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Перед использованием должен быть смешан с трейсером, HRP-анти-РЭА.

Трейсер, фермент-меченые анти-РЭА антитела	1 x 0.75 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Сток-раствор пероксидазы хрена с анти-РЭА моноклональными мышиными антителами, ≈ 60 µг/мл. Содержит консерванты. Перед использованием должен быть смешан с Биотинилированными анти -РЭА.

HRP-Субстрат ТМБ	1 x 12 мл	2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконах

Готов для использования. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3 ’, 5, 5’ тетраметилбензидин (ТМБ).

Стоп-раствор	1x 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит 0,12 М раствор соляной кислоты (HCl). Готов к использованию.

Концентрат промывочного буфера	1 x 50 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконах

Содержит ТРИС-HCl солевой раствор с Tween 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности

Раствор HRP-субстрата ТМВ должен быть бесцветный или слегка голубоватый. Голубой цвет свидетельствует о загрязнении реагента и раствор должен быть выброшен.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики In Vitro:

• Только для профессионального использования.

• Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

или региональными или национальными инструкциями.
• Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
• Следуйте принятым инструкциям при утилизации всех отработанных материалов.

Предосторожности:
Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Но, так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие инфекционных заболеваний, передающихся с кровью, то со всеми материалами человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Сбор и подготовка образцов
Данный набор CanAg CEA EIA разработан для использования сыворотки. Соберите кровь венепункцией и отделите сыворотку стандартной процедурой. Сыворотку можно хранить при 2—8°C в течение 2 дней до анализа. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре -20°C или ниже.
Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА
Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки
1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей (микролитры и миллилитры). 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна.
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа
1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору CanAg CEA EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры (20-25ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºC. Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны вручную.
3. Перед внесением калибраторов, контролей и образцов пациентов в лунки рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов твердофазное антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
   Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендуется использовать режим промывки стрип и режим промывки с переливом при объеме дозирования 800 мкл. Вошер не следует оставлять с на длительное время заполненным буфером для промывок, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
5. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к загрязнению. Для лучшей стабильности TMB HRP-субстрата, чтобы избежать загрязнения реагента налейте необходимое количество реагента из флакона в тщательно очищенный резервуар или, предпочтительно, в одноразовую пластиковую ванночку. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).

6. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику дозирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте переноса материала из лунки в лунку, для этого не прикасайтесь к поверхности жидкости. Правильный метод дозирования имеет особое значение при работе с раствором HPR-субстрата TMB.

Приготовление реагентов	**Стабильность**
1. Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºC в герметичном контейнере

Налейте 50 мл концентрата промывочного раствора в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

2. Раствор антител	3 недели при 2-8ºC

Приготовьте нужный объем раствора антител смешиванием 50 мкл раствора Трейсера (меченного ферментом антител) с 1 мл раствора Биотинилированных анти-РЭА антител на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера, HRP анти-РЭА (мкл)	Биотинилированные анти-РЭА антитела (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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое раствора трейсера, HRP анти-РЭА во флакон с Биотинилированными анти-РЭА антителами и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера, HRP анти-РЭА перенесен во флакон с разбавителем трейсера.

Замечание: Раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºC. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводите каждое измерение калибраторов, контролей и образцов пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC).

1. Начните с приготовления промывочного раствора и раствора антител. Очень важно использовать чистые контейнеры. Точно следуйте данной инструкции.

2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. Немедленно верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и плотно закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.

3. Добавьте 25 мкл калибраторов РЭА (кал 0, 2, 5, 15, 50, 75), контролей (к) и образцов пациентов (обр) в лунки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. 0	кал. 50	обр. 1		
B	кал. 0	кал. 50	обр. 1		
C	кал. 2	кал. 75	обр. 2		
D	кал. 2	кал. 75	обр. 2		
E	кал. 5	к. 1			
F	кал. 5	к. 1			
G	кал. 15	к. 2			
H	кал. 15	к. 2			

4. Добавьте 100 мкл Раствора антител в каждую лунку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкости, удерживая наконечники чуть выше верхнего края лунок при дозировании, и избегайте касания наконечниками стрипов или поверхности жидкости.

5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 5 минут) при комнатной температуре (20-25ºC) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшетов.

6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4.”Замечаний по процедуре анализа”.

7. Добавьте 100 мкл HRP-субстрата ТМБ в каждую лунку, в той же последовательности, как в п. 4. Раствор HRP-субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.

8. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.

9. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена как описано в шаге 9а.

9а. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Диапазон измеряемых значений
Диапазон измерения данного набора CanAg CEA EIA составляет от 0,25 до 75 µг/л. Если концентрации РЭА превышают этот диапазон, рекомендуется разбавить образец калибратором 0 µг/л.

Контроль качества
Для контроля достоверности анализа используют РЭА Контроль 1 и Контроль 2. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.
Если контрольные результаты не укладываются в указанный диапазон, тщательно проверьте все реагенты и фотометр и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референсные материалы
В качестве референсного стандарта может быть использован 1 Международный Стандарт – IRP 73/601. Значения РЭА в калибраторах и контролях были оценены по внутреннему набору референсных стандартов производителя, чьи концентрации соотносимы с IRP 73/601. Если результаты анализа представляются в МЕ/л IRP 73/601, используйте фактор пересчёта 13.5, т. е. 1 µг/л соответствует 13.5 МЕ/л.

Расчет результатов
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора РЭА, указанную на флаконах.
Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 µг/л.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен быть использован как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 µг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 µг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

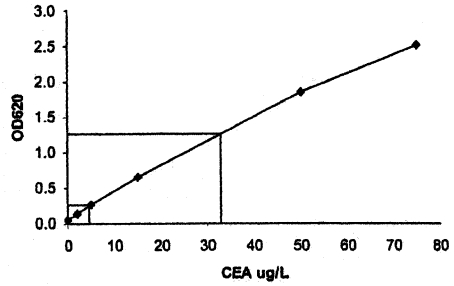
Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого калибратора, против соответствующих концентраций РЭА (в µг/л) (см. рисунок ниже). Значения концентраций РЭА в образцах для каждого пациента находят по калибровочной кривой.

Если образец имеет значение РЭА больше ≈ 75 µг/л, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 или 1/100 калибратором 0 µг/л и проанализировать повторно для получения точной концентрации РЭА.
1 : 10 разбавление = 50 мкл образца + 450 мкл нулевого калибратора (0 µг/л)
1 : 100 разбавление = 50 мкл разбавленного 1:10 + 450 мкл нулевого калибратора (0 µг/л)

Концентрация РЭА в неразбавленных образцах вычисляются следующим образом:
Разбавление 1/10: 10 x Измеренное значение
Разбавление 1/100: 100 x Измеренное значение

Пример результатов

Образец	Значения калибраторов	Значения поглощения (А)	РЭА µг/л
Калибратор 0	0 µг/л	0.050	
Калибратор 2	2 µг/л	0.131	
Калибратор 5	5 µг/л	0.259	
Калибратор 15	15 µг/л	0.657	
Калибратор 50	50 µг/л	1.857	
Калибратор 75	75 µг/л	2.519	
Образец А		0.220	4.1
Образец В		1.290	32.3



Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Ограничения метода
Уровни РЭА не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор РЭА не должен использоваться для скрининга онкологических заболеваний. Результаты анализа должны интерпретироваться только в совокупности с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний и РЭА-тест не должен замещать другие клинические исследования.
Антитела к реагентам (человеческие анти-мышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела) в образцах сывороток пациентов могут иногда влиять на результаты анализа, несмотря на то, что в буфер добавлены специфические блокирующие агенты.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (9, 10). В исследовании Grimsey и др. (9) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (11).

Ожидаемые значения

Были выбраны 95 здоровых доноров крови и 117 здоровых людей в возрасте от 60 до 64 лет. Нижняя и верхняя границы нормального диапазона оценивались согласно рекомендациям IFCC для непараметрического статистического анализа. Референсный интервал включает 95% фракцию референсного распределения. Референсные пределы, соответственно, могут быть установлены как 2.5% (нижний) и 97.5% (верхний) квантили. Эти пределы отсекают по 2.5% фракции значений от каждого «конца» референсного распределения. Непараметрический метод дал следующие результаты

	Среднее (µг/л)	**SD (µг/л)**	**Медиана (µг/л)**	**Диапазон (µг/л)**	**Верхний предел (центральной 95% фракции)**
Здоровые доноры крови (n=95)	1,3	1,0	1,0	0,5-9,1	3,2 µг/л
Здоровые люди в возрасте от 60 до 64 лет (n=117)	2,4	1,7	1,9	0,5-8,8	7,4 µг/л

96% здоровых людей имели значения ниже 5 µг/л. Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, подборка пациентов и т. д.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Точность

Точность оценивалась согласно NCCLS EP5-A (7) с использованием 4 уровней концентраций пулированной замороженной сыворотки, содержащей добавленный РЭА, и 2-х разных комбинаций реагентов набора CanAg CEA EIA. Каждый образец был произвольно пипетирован (n=2/анализ) и анализировался дважды каждый день в течение 20 дней подряд.

Образец	Повторы	Среднее, µг/л	SD (µг/л) внутри серии	CV% (µг/л) внутри серии	SD (µг/л) между суткам и	CV% (µг/л) между суткам и
1	80	2,78	0,07	2,5	0,08	2,7
2	80	5,97	0,15	2,6	0,11	1,8
3	80	20,8	0,44	2,1	0,36	1,7
4	80	57,3	1,57	2,7	0,87	1,5

Предел обнаружения

Предел обнаружения данного набора CanAg CEA EIA составил ≤ 0,25 µг/л и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения согласно формуле:

$$\frac{2\times SD\ Калибратора\ 0}{OD\ Калибратора\ 2 - OD\ Калибратора\ 0} \times 2\ µг/л$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки были приготовлены добавлением РЭА человека к нормальным образцам сыворотки. % извлечения был найден в диапазоне 90-115%.

Хук-эффект

При считывании ОП на длине волны 405 нм6 например, при применении альтернативной процедуры анализа с добавление стоп-раствора, Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 250 000 µг/л. При считывании ОП на 620 нм для образцов с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый. Это может привести к ложно заниженным значениям оптической плотности до пределов калибровочной кривой, что и отмечается как Хук-эффект. При считывании ОП на длине волны 620 нм Хук-эффект наблюдается для образцов с концентрациями более 2 000 µг/л.

Чтобы избежать ошибочно заниженных результатов за счет Хук-эффекта при считывании ОП с фильтром 620 нм, рекомендуется использовать альтернативную процедуру измерения с фильтром 405 нм для пациентов, обследующихся первый раз, или пациентов, у которых ожидаются высокие значения РЭА.

Линейность

Образцы пациентов были последовательно разбавлены разбавителем образцов и проанализированы. Полученные значения были в пределах 90-120% от ожидаемых значений.

Специфичность

Набор CanAg CEA EIA сконструирован на основе двух мышиных моноклональных антител: захватывающих Mab 12-140-10 против Gold-эпитопа IV и детектирующих Mab 12-140-1 против Gold-эпитопа V (4, 5).

Возможные источники интерференции были определены согласно рекомендации NCCLS EP7-P (8). Были проверены следующие вещества и не найдена интерференция с ними:

	Концентрация с незначительной (±10%) интерференцией
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин неконъюгированный	0,6 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 200 нг/мл. Средняя концентрация РЭА была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. РЭА с добавкой биотина / Средняя конц. РЭА с добавкой только разбавителя).

Уровень РЭА	Конц. Биотина, нг/мл	Ожидаемая конц. РЭА, µг/л	Наблюдаемая конц. РЭА, µг/л	Извлечение, %
Низкая	15	3.72	3.53	95
Высокая	15	39.5	37.8	96
Низкая	30	3.87	3.62	93
Высокая	30	40.5	37.5	92
Низкая	60	3.90	3.13	80
Высокая	60	41.3	32.5	79
Низкая	200	3.76	1.21	32
Высокая	200	40.9	14.9	36
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 33 нг/мл				

Сравнение методов

CanAg CEA EIA сравнивали с набором Wallac Delfia CEA.

При анализе 77 образцов человеческих сывороток в диапазоне 0–790 µг/л линейный регрессионный анализ дал следующие результаты:

CanAg CEA = 0.90 x DelfiaCEA + 0.53, r =1.00

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Gold P. and Freedman S. O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp Med 122: 467–481.*
2. Thompson J.A. and Zimmerman W. (1988) The carcinoembryonic antigen gene family: Structure, expression and evolution. *Tumor Biol,; 9: 63–83.*
3. Börmer, O.P. (1992) Thesis "Immunoassays for Carcinoembryonic antigen, Specificity and Interferences", ISBN 82–7633–014–2.
4. Hammarström S. et al. (1989) Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. Cancer Res 49: 4852–4858.
5. Tumor Marker Expert Panel, ASCO (1996) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin Oncol; 14: 2843–2877.*
6. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry 15: 26-29.*
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
9. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
10. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
11. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg CEA EIA Кат. N 401-10

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

<table>
<tr><th>Шаг</th><th>Флакон / Планшет</th><th>Действия</th></tr>
<tr><td>1. Приготовьте промывочный раствор</td><td>WASHBUF | 25X
Концентрат промывочного раствора, 25X</td><td>Разбавьте 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной воды или деионизированной воды</td></tr>
<tr><td>Приготовьте рабочий раствор трейсера</td><td>CONJ | Anti-CEA Конъюгат анти-РЭА

BIOTIN | Anti-CEA
Биотинилированные анти-РЭА-антитела</td><td>Смешайте 50 мкл трейсера, HRP-анти-РЭА с 1 мл биотинилированных антител на каждый стрип.
<table>
<tr><th>Кол-во стрипов</th><th>Раствор трейсера, HRP-анти-РЭА (мкл)</th><th>Биотинилированные антитела (мл)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr>
<tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr>
<tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr>
<tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr>
<tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr>
<tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr>
<tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr>
<tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr>
<tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr>
<tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr>
<tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>2. Промывка</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>Промойте каждую лунку один раз промывочным раствором</td></tr>
<tr><td>3. Добавьте калибраторы, контроли и образцы</td><td>CAL | CEA
Калибраторы 0, 2, 5, 15, 50, 75.

CONTROL | CEA Контроли 1, 2

Образцы</td><td>25 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>4. Добавьте Раствор антител</td><td>ANTIBODY SOLUTION</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>5. Инкубация</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>1 час, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>6. Промывка</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>Промыть каждую лунку 6 раз промывочным раствором</td></tr>
<tr><td>7. Добавление ТМБ HRP-субстрата</td><td>SUBS | TMB
Субстрат ТМБ</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>8. Инкубация</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>30 минут, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>9. Считывание оптической плотности</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>620 нм</td></tr>
<tr><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td>9 альтерн. Добавьте стоп-раствор</td><td>STOP
Стоп-раствор</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>10. альтерн. Инкубация</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>1 мин, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>11. альтерн. Считывание оптической плотности</td><td>MICROPLA
Планшет</td><td>Считать при 405 нм в течение 15 минут</td></tr>
</table>

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg NSE EIA

Кат. N 420-10

IVD

Инструкция по применению. Версия - 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения


Использовать до



Номер лота


Дата производства



Только для диагностики In Vitro



Номер по каталогу



Температурный режим



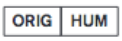
Содержит достаточные количества для «96» определений


Обратитесь к инструкции по применению

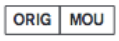


Компоненты набора

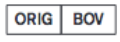

Биологическая опасность



Человеческого происхождения



Мышиного происхождения



Крупного рогатого скота


Растворить в


Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg NSE EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg NSE EIA предназначен для количественного определения нейронспецифической енолазы (НСЕ) в человеческой сыворотке.

Введение и объяснение метода

Гликолитическая ферментная енолаза (2-фосфо-D-глицератгидролиаза, EC 4.2.1.11) существует в виде нескольких димерных изоферментов (αα, αβ, αγ, ββ и γγ), образованных из трех субъединиц: α, β и γ. γ-единица обнаружена или в гомологических γγ-, или в гетерологических αγ-изоферментах, и известна как нейро-специфическая енолаза (НСЕ). Моноклональные антитела, используемые в данном наборе, связаны с γ-субъединицей фермента и, следовательно, детектируют и γγ и αγ формы (1,2).
Уровни НСЕ низки у здоровых людей и пациентов с доброкачественными заболеваниями. Повышенные уровни обычно обнаруживаются у пациентов с нейроэндокринными опухолями, особенно с мелкоклеточным раком легких (3) и нейробластомой (4).
Количественное определение НСЕ в сыворотке важно для пациентов с подозрением на мелкоклеточный рак легких или нейробластому для дифференциальной диагностики, мониторинга эффективности лечения и обнаружения рецидивов болезни (5,6).

Принцип метода

Настоящий набор CanAg NSE EIA является твердофазным неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на использовании двух типов моноклональных мышиных антител, направленных против двух различных антигенных детерминант в молекуле НСЕ. Используемые моноклональные антитела связываются с γ-субъединицей фермента и, следовательно, детектируют и γγ, и αγ формы. Калибраторы и сыворотки пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-НСЕ антителами MAb E21 и моноклональными антителами E17, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) в покрытых стрептавидином лунках микропланшета.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

После промывки в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству НСЕ, присутствующей в образце.
Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм (или опционально, при 405 нм после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация НСЕ в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg NSE EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживать.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение

MICROPLA

Микропланшет 1 планшет 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 разделяемых лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы НСЕ. 5 флаконов, лиофилизированные. 4 недели при 2-8ºC 3 месяца при –20°C

CAL NSE A — НСЕ A 1x0.75 мл
CAL NSE B — НСЕ B 1x0.75 мл
CAL NSE C — НСЕ C 1x0.75 мл
CAL NSE D — НСЕ D 1x0.75 мл
CAL NSE E — НСЕ E 1x0.75 мл

Лиофилизированные калибраторы содержат человеческий НСЕ в белковом матриксе, 0.01% неазидного консерванта. Перед использованием должны быть разведены в 0.75 мл дистиллированной воды.
Замечание: точные концентрации НСЕ специфичны для каждого лота и указаны на этикетках каждого флакона.

BIOTIN Anti-NSE

Биотин/анти НСЕ 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Биотинилированные анти-НСЕ моноклональные антитела мыши ≈ 2 мкг/мл.
Содержит фосфатный буфер (pH 7.1), бычий сывороточный альбумин, блокирующие агенты, инертный голубой краситель и 0.01% метилизотиазолон (МИТ) в качестве консерванта. Должен быть смешан с трейсером HRP-анти-НСЕ перед использованием.

CONJ Anti-NSE

Трейсер 1 x 0.75 мл 2-8ºC до истечения
HRP-анти-НСЕ. . срока годности указанного на флаконе
Сток-раствор конъюгата HRP с анти-НСЕ моноклональными антителами мыши ≈ 40 мкг/мл. Должен быть смешан с Биотин/анти-НСЕ перед использованием. Содержит 0.02% МИТ, 0.02% бромнитродиоксана и 20 ppm Proclin™ 300 в качестве консервантов.

SUBS TMB

HRP-Субстрат ТМБ 1 x 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе
Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ).

STOP

Стоп-раствор 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе
Готов к использованию. Содержит 0.12 М соляную кислоту.

WASHBUF 25X

Концентрат буфера промывок 1 x 50 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой. Содержит Tris-HCl буферный солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта.

Показатели нестабильности
Раствор **HRP**-субстрата ТМВ должен быть бесцветным или слабо голубым. Синее окрашивание указывает на то, что реагент был загрязнен и должен быть выброшен.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

• Только для диагностики in vitro
• Только для профессионального использования
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.

• Со всеми образцами, взятыми у пациентов, необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.
• Следуйте локальным руководствам по утилизации всех отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Но, так как не существует метода, который бы полностью исключал присутствие возбудителей инфекционных заболеваний, работа и утилизация препаратов человеческого происхождения, поставляемых с данным набором, должна проводиться как с потенциально опасными материалами.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Набор CanAg NSE EIA предназначен для использования сыворотки. Соберите кровь венепункцией и отделите сыворотку стандартной процедурой.

Сыворотка должна быть отделена в течение 60 минут после сбора образцов, чтобы избежать выхода NSE из клеток крови. Не используйте гемолизированные образцы. Использование плазмы не рекомендуется, так как значительное количество NCE может высвобождаться из тромбоцитов.

Образцы могут храниться 24 часа при 2-8ºC. Для более длительного хранения требуется замораживать их при -70ºC или ниже. Образцы нельзя хранить в саморазмораживающихся холодильниках. Замораживайте только один раз. Образцы нельзя оттаивать и опять замораживать перед анализом. Позвольте замороженным образцам оттаять при комнатной температуре, ТЩАТЕЛЬНО перемешайте осторожным многократным переворачиванием перед анализом. Образцы, содержащие видимые частицы, необходимо центрифугировать перед анализом при 10000 x g в течение 10 минут для удаления частиц, которые могут образовываться при замораживании и оттаивании. Анализируйте образцы не позднее чем через час после того, как они растаяли.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер

Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять от 1 до 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл..

3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки

с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна. Пипетки для дозирования микрообъемов жидкостей.

5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Для растворения калибраторов и контролей NCE, для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать инструкцию к настоящему набору CanAg NSE EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов.

   Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.

1. Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры (20-25ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºC. Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны.
2. Перед внесением калибраторов и образцов пациентов в лунки рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
3. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.

   Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.

   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Вошер не следует оставлять на длительное время заполненным буфером для промывок, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
4. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к загрязнению. Для лучшей стабильности TMB HRP-субстрата, чтобы избежать загрязнения реагента налейте необходимое количество реагента из флакона в тщательно очищенный резервуар или, предпочтительно, в одноразовую пластиковую ванночку. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику дозирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте переноса материала из лунки в лунку, для этого не прикасайтесь к поверхности жидкости. Правильный метод дозирования имеет особое значение при работе с раствором HRP-субстрата TMB.

Приготовление реагентов	**Стабильность приготовленного реагента**
Калибраторы HCE	4 недели при 2-8°C 3 месяца при -20°C

Добавьте точно 0.75 мл дистиллированной воды в каждый флакон и хорошо перемешайте. Оставьте как минимум на 15 минут при комнатной температуре для полного растворения.
Замечание: точные концентрации калибраторов указаны на флаконах и должны использоваться для расчетов.

Буфер для промывок	2 недели при 2-25°C в закрытом контейнере

Налейте 50 мл концентрата буфера для промывок в чистый контейнер и добавьте 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды (разведение в 25 раз).

Раствор антител	3 недели при 2-8°C

Приготовьте требуемое количество раствора антител, смешав по 50 мкл трейсера – HRP/анти-HCE и 1 мл биотинилированных анти-HCE антител для анализа на 1 стрипе:

Количество стрипов	**Трейсер HRP/анти-HCE, (мкл)**	**Биотин/анти-HCE, (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

Убедитесь, что пластик и стеклянная посуда для приготовления раствора антител чистые.
Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с трейсером, HRP/анти-HCE во флакон с Биотином анти-HCE и перемешайте. Проверьте, полностью ли перенесено содержимое флакона с трейсером.
Замечание: раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8°C. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА
Проводите анализ образцов и калибраторов в дублях.
Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа.
Все реагенты и образцы перед анализом должны достичь комнатной температуры (20—25 °C).

1. Начните с приготовления калибраторов HCE, буфера для промывок и раствора антител. Очень важно использовать только чистые емкости для приготовления реагентов. Строго соблюдайте инструкции

2. Закрепите требуемое количество стрипов в держателе. Немедленно верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.

3. Внесите по 25 мкл калибраторов HCE (кал. A, B, C, D, E) и образцов сывороток пациентов (пр) в лунки согласно следующей схеме:

	1	**2**	**3**	**4**	**5 и т. д.**
A	кал. A	кал. E	пр. 4		
B	кал. A	кал. E	и т. д.		
C	кал. B	пр. 1			
D	кал. B	пр. 1			
E	кал. C	пр. 2			
F	кал. C	пр. 2			
G	кал. D	пр. 3			
H	кал. D	пр. 3			

4. Внесите по 100 мкл раствора антител в каждую лунку, используя одно- или восьмиканальную калиброванную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкостей между лунками, держите наконечник пипетки чуть выше края лунки и избегайте касания стрипов или поверхности жидкости.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 10 минут) при комнатной температуре (20-25°C) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере.
6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз.
7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл HRP-субстрата TMB, таким же образом, как в шаге 4. Раствор HRP-субстрата TMB следует добавлять по возможности быстро, время между добавлением в первую и последнюю лунку не должно превышать 5 минут.
8. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если в лаборатории нет микропланшетного спектрофотометрического ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в шаге 10.

10. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, перемешайте и после этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

С помощью данного набора CanAg NSE EIA можно измерить концентрации НСЕ в диапазоне от 1 до приблизительно 150 мкг/л. Если концентрация НСЕ в образце выше диапазона измеряемых значений, образец рекомендуется развести человеческой сывороткой с низкой концентрацией НСЕ и проанализировать еще раз.

Замечание: Сыворотка, используемая для разведения, тоже должна быть проанализирована для определения концентрации эндогенного НСЕ (см. "Расчет результатов").

Контроль качества

Контрольные сыворотки CanChek Tumor Marker Control Sera уровни 1 и 2 (заказываются отдельно, кат. № 107-20) рекомендуются для оценки достоверности результатов анализа. Если получаемые для контрольных сывороток значения не попадают в диапазон допустимых значений, специфичный для контрольных сывороток, необходимо провести полную проверку реагентов и оборудования и повторить анализ.

Референсные материалы

Так как не существует общепризнанных международных референсных материалов для антигена НСЕ, калибраторы, входящие в состав данного набора CanAg NSE EIA прокалиброваны по внутреннему референсному стандарту НСЕ производителя.

Расчет результатов

Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора НСЕ, указанную на каждом флаконе.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор А должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 мкг/л.
- Метод аппроксимации гладкий сплайн. Калибратор А должен быть использован как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор А должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор А должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого калибратора, против соответствующих концентраций НСЕ (в мкг/л) (см. рисунок 1). Значения концентраций НСЕ в образцах для каждого пациента рассчитываются по калибровочной кривой исходя из среднего значения оптической плотности для каждого образца.

Если образец дает значение НСЕ больше значения калибратора Е, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 нормальной человеческой сывороткой для получения точного результата.

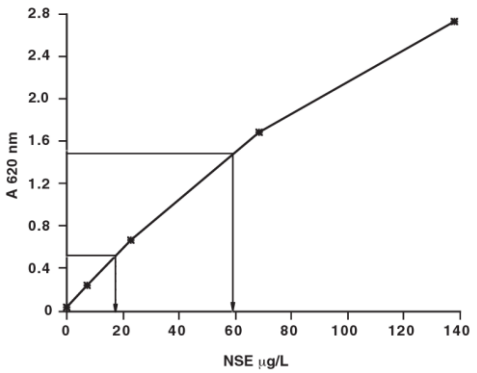
Результаты затем вычисляются следующим образом:

Разведение 1/10:

10 x ([NSE] $_{\text{разведенного образца}}$ - (0.9 x [NSE] $_{\text{нормальной человеческой сыворотки}}$))

Пример результатов

Образец	Значение калибратора	Оптическая плотность (А)	НСЕ мкг/л
Калибратор А	0 мкг/л	0.037	
Калибратор В	7.5 мкг/л	0.238	
Калибратор С	22.9 мкг/л	0.663	
Калибратор D	68.4 мкг/л	1.688	
Калибратор Е	138.0 мкг/л	2.720	
Образец 1		0.518	17.5
Образец 2		1.474	57.8



Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Точная концентрация НСЕ указана на этикетке каждого флакона с калибратором.

Ограничения метода

Уровни НСЕ не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор НСЕ не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты анализа должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний, и НСЕ-тест не должен замещать другие клинические исследования.

Повышенные значения НСЕ, обусловленные не опухолями, могут встречаться у пациентов на диализе и пациентов с лейкемиями.

Сыворотка не должна иметь видимого гемолиза (оптическая плотность не мутного образца при длине

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

волны 500 нм не должна превышать 0.3), так как эритроциты содержат значительные количества НСЕ (7). Продолжительное хранение цельной крови может вызывать высвобождение НСЕ из клеток крови.
Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), присутствующие в образце пациента, могут влиять на анализ, даже несмотря на специфические блокирующие агенты, входящие в буфер.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (10, 11). В исследовании Grimsey и др. (10) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (12).

Ожидаемые значения
Данным методом CanAg NSE EIA был измерен уровень НСЕ в образцах крови 495 клинически здоровых доноров крови. Концентрация НСЕ в 97.5% полученных результатов была не выше 10.5 мкг/л и в 95% случаев – не выше 9.9 мкг/л. Медиана уровня в сыворотке составила 6.5 мкг/л.
Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений для интересующей популяции и процедур сбора образцов.

Характеристики набора
Точность
Точность была определена согласно руководству EP5-A NCCLS (8), с использованием четырех уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленную НСЕ. Каждый образец был случайным образом внесен в дублях, и проанализирован дважды в день, каждый день в течение 20 дней.
Анализ проводился на протяжении 40 месяцев, более чем тремя различными операторами и с использованием наборов CanAg NSE EIA из 20 различных лотов.

Образец	Реплики	Среднее мкг/л	SD, мкг/л, внутри серии	CV внутри серии, %	SD, мкг/л, между сутками	CV между сутками, %
NSE1	80	10.3	0.24	2.3	0.57	5.5
NSE2	80	23.7	0.82	3.5	0.97	4.1
NSE3	80	48.2	1.02	2.1	1.93	4.0
NSE4	80	92.7	1.60	1.7	3.44	3.7

Предел обнаружения
Предел обнаружения для данного набора CanAg NSE EIA < 1 мкг/л определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности калибратора A плюс 2 стандартных отклонения, и рассчитан по формуле:

$$\frac{2 \times SD\ CAL\ A}{OD\ CAL\ B - OD\ CAL\ A} \times [CAL\ B]\ мкг/л$$

Где OD – оптическая плотность, SD – стандартное отклонение, CAL – калибратор.

Хук-эффект
Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями НСЕ до 200 000 мкг/л.

Линейность
Образцы пациентов были разбавлены разбавителем образцов НСЕ и проанализированы. Полученные значения были в пределах 93-101% от ожидаемых значений.

Специфичность
Используемые моноклональные антитела специфичны для γ-субъединицы енолазы. Измеряемые перекрестные реакции с другими енолазами не наблюдались. В соответствии с руководством EP7-P NCCLS (9) было проведено исследование возможных источников интерференции. Следующие вещества были проверены в указанных концентрациях и показано, что они не оказывают значительного влияния на результаты анализа:

	Концентрации, не оказывающие значительного (± 10%) влияния на результаты
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин, несвязанный	0.6 мг/мл

Интерференция с биотином
Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 600 нг/мл. Средняя концентрация НСЕ была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. НСЕ с добавкой биотина / Средняя конц. НСЕ с добавкой только разбавителя).

Уровень НСЕ	**Конц. биотина**	**Ожид. конц. НСЕ, нг/мл**	**Наблюд. конц. НСЕ, нг/мл**	**Извлечение, %**
Низкая	15	13.3	13.1	98
Высокая 1	15	75.7	74.3	98
Высокая 2	15	59.5	58.8	99
Низкая	30	13.3	13.1	98
Высокая 1	30	75.5	73.3	97
Высокая 2	30	59.7	57.1	96
Низкая	60	13.2	12.5	95
Высокая 1	60	75.7	68.0	90
Высокая 2	60	60.5	58.4	97
Низкая	600	13.3	1.75	13
Высокая 1	600	74.8	10.3	14
Высокая 2	600	62.8	4.97	8
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного				

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

теста (≥ 10%). составила 78 нг/мл

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Paus E. and Nustad K., (1989) Immunoradiometric Assay for αγ- and γγ-Enolase (Neuron-Specific Enolase), with Use of Monoclonal Antibodies and Magnetizable Polymer Particles. *Clin. Chem.* 35: 2034-2038.
2. Dahlén U., Karlsson B., Nilsson O. and Uhl W., (1995) Development of an Enzyme Immunoassay, NSE-Enzymun Test For Determination of Neuron-Specific Enolase. XXIII International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Montréal, Québec .
3. Cooper E.H., (1994) Neuron-specific enolase. *The International Journal of Biological Markers 9(4):205-10.*
4. Cooper E.H., Pritchard J., Bailey C.C. and Ninane J., (1987) Serum neuron-specific enolase in children's cancer. *Br. J. Cancer* 56: 65–67.
5. Schneider, P. M. et al., (2002) Lung Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACC Press, Washington pp 287-303.
6. Bonner J. A., Sloan JA., Rowland KM., Klee GG., Kugler JW., Mailliard JA., Wiesenfeld M., Krook JE.,Maksymiuk AW., Shaw EG., Marks RS and Perez EA., (2000) Significance of Neuron-specific Enolase Levels before and during Therapy for Small Cell Lung Cancer. Clinical Cancer Research 6: 597-601.
7. Påhlman S., Esscher T., Bergvall P. and Odelstad L., (1984) Purification and characterization of human neuron-specific enolase: Radioimmunoassay development. *Tumor Biol.* 5: 127–139.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
10. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
11. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
12. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO®
Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg NSE EIA Кат. № 420-10

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

<table>
<tr><th>Шаг</th><th>Флакон/Планшет</th><th>Действия</th></tr>
<tr><td>1. Приготовьте калибраторы НСЕ</td><td>Калибраторы НСЕ A, B, C, D, E</td><td>Добавьте 0.75 мл дистиллированной воды в каждый флакон и осторожно перемешайте. Оставьте на 15 минут.
Замечание: точная концентрация каждого калибратора указана на этикетке. Это значение должно использоваться для расчетов.</td></tr>
<tr><td>2. Приготовьте буфер для промывок</td><td>Концентрат буфера для промывок</td><td>Разбавьте 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды</td></tr>
<tr><td>3. Приготовьте раствор антител</td><td>Трейсер Биотин/анти-НСЕ</td><td>Смешайте 50 мкл трейсера, HRP/анти-НСЕ с 1 мл Биотин анти-НСЕ на каждый стрип.
<table>
<tr><th>Количество стрипов</th><th>Трейсер HRP/анти-НСЕ, (мкл)</th><th>Биотин/анти-НСЕ, (мл)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr>
<tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr>
<tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr>
<tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr>
<tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr>
<tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr>
<tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr>
<tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr>
<tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr>
<tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr>
<tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>4. Промывка</td><td>Планшет</td><td>Промойте каждую лунку один раз промывочным раствором</td></tr>
<tr><td>5. Добавьте калибраторы и образцы</td><td>A, B, C, D, E</td><td>25 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>6. Добавьте раствор антител</td><td>Раствор антител</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>7. Инкубация</td><td>Планшет</td><td>1 час, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>8. Промывка</td><td>Планшет</td><td>Промойте каждую лунку 6 раз промывочным раствором</td></tr>
<tr><td>9. Добавьте ТМБ HRP-субстрат</td><td>Субстрат ТМБ</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>10. Инкубация</td><td>Планшет</td><td>30 минут, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>11. Считывание оптической плотности</td><td>Планшет</td><td>620 нм</td></tr>
<tr><td>Альтернативно:</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>11a. Добавьте стоп-раствор</td><td>Стоп-раствор</td><td>100 мкл в каждую лунку</td></tr>
<tr><td>12a. Инкубация</td><td>Планшет</td><td>1 мин, встряхивая при комнатной температуре</td></tr>
<tr><td>13a. Считывание оптической плотности</td><td>Планшет</td><td>Считайте при 405 нм в течение 15 минут</td></tr>
</table>

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg AFP EIA

Кат. N 600-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором.
Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg AFP EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор CanAg AFP EIA предназначен для количественного определения α-фетопротеина (АФП) в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

α-фетопротеин – фетальный эквивалент альбумина, гликопротеин с молекулярной массой 67 кДа, продуцируемый в период эмбрионального развития и присутствующий в высокой концентрации в крови плода и амниотической жидкости. В норме, в сыворотке крови у мужчин и небеременных женщин α-фетопротеин присутствует в низких концентрациях. Однако его концентрация в сыворотке крови может быть значительно повышена у пациентов со злокачественными образованиями печени, яичника или тестикул. Количественное определение АФП в сыворотке крови может быть полезным при ведении пациентов с подозрением или диагностированным раком печени или герминогенными опухолями тестикул или яичника (1, 2).

ПРИНЦИП МЕТОДА

CanAg AFP EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на прямой «сэндвич»-технологии. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-АФП моноклональными антителами и анти-АФП моноклональными антителами, меченными пероксидазой хрена (HRP) в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. После промывки в каждую лунку добавляется забуференный раствор субстрат/хромогена (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству АФП в образце.
Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре с фильтром 620

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нм (или, альтернативно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация АФП в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg AFP EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и хранятся и используются, согласно инструкции. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
MICROPLA		
Микропланшет	1 планшет	2-8ºC до истечения срока годности

12x8 микролунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Калибраторы АФП	6 флаконов	до истечения срока годности при 2-8ºC
CAL AFP 0	0 µг/л	1x0.75 мл
CAL AFP 5	5 µг/л	1x0.75 мл
CAL AFP 25	25 µг/л	1x0.75 мл
CAL AFP 100	100 µг/л	1x0.75 мл
CAL AFP 250	250 µг/л	1x0.75 мл
CAL AFP 500	500 µг/л	1x0.75 мл

Содержат человеческий АФП в солевом растворе Трис-HCl буфере с бычьим сывороточным альбумином, инертный желтый краситель, 0.01% метил-изоциазолин (MIT) в качестве консерванта. Готовы к использованию.

Контроли АФП	2 флакона,	до истечения срока годности при 2-8ºC
CONTROL AFP 1		1x0.75 мл
CONTROL AFP 2		1x0.75 мл

Содержат человеческий АФП в солевом растворе Трис-HCl буфере с бычьим сывороточным альбумином, 0.01% MIT в качестве консерванта. Готовы к использованию.

BIOTIN Anti-AFP		
Биотин/анти-АФП, HRP-анти-АФП	1x15 мл	2-8ºC до истечения срока годности

Биотинилированные анти-АФП моноклональные антитела мыши, ≈ 1 µг/мл. Содержат фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7.2), бычий сывороточный альбумин, бычий иммуноглобулин, блокирующие агенты, Tween-20, инертный синий краситель, и 0.01% MIT в качестве консерванта. Должен быть смешан с трейсером, HRP-анти-АФП, перед использованием.

CONJ Anti-AFP		
Трейсер, HRP-анти-АФП	1 x 0.75 мл	2-8ºC до истечения срока годности

Сток-раствор HRP с мышиными моноклональными анти-АФП антителами мыши, ≈ 20 µг/мл. Содержит консерванты. Должен быть перед использованием смешан с Биотин/анти-АФП.

SUBS TMB		
HRP-Субстрат ТМБ	1 x 12 мл	2-8ºC до истечения срока годности

Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

STOP		
Стоп-раствор	1 x 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности

Содержит 0.12 M соляную кислоту. Готов к использованию.

WASHBUF 25X		
Концентрат 25x буфера для промывки	1x50 мл	2-8ºC до истечения срока годности

Содержит Tris-HCl буферный солевой раствор с Twin 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности

Раствор HRP-субстрата TMB должен быть бесцветным или слабо голубым. Голубое окрашивание указывает на то, что реагент был контаминирован и должен быть утилизирован.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики *in vitro*.

- Только для профессионального использования.
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или региональными или национальными инструкциями.
- Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Следуйте принятым правилам утилизации отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предосторожности

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, передающихся с кровью, то с реагентами, приготовленными из материалов человеческого происхождения, надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.

Сбор и подготовка образцов

Набор CanAg AFP EIA предназначен для использования сыворотки. Соберите кровь из вены венепункцией и отделите сыворотку стандартными процедурами. Образцы могут храниться при 2-8ºC до 2 дней. Для более длительного хранения образцов рекомендуется -20ºC или более низкая температура. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºC в течение ночи и затем доведите образцы до комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое устройство для промывки с возможностью выполнять 1 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если не используется автоматическое устройство для промывки микропланшетов, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения объемов в микролитрах и миллилитрах Наличие 8-канальной пипетки для внесения объёма 100 мкл рекомендуется, но не обязательно.
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Для приготовления буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать инструкцию к набору CanAg AFP EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Реагенты перед использованием должны быть доведены до комнатной температуры (20–25°C). Для получения наиболее точных результатов анализ следует выполнять при температуре между 20 и 25ºC. Замороженные образцы должны быть аккуратно, но тщательно перемешаны путем плавного переворачивания после оттаивания.
3. Перед внесением калибраторов и образцов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Требование эффективной и тщательной промывки для отделения связанного и несвязанного антигена и реагентов от комплексов твердофазное антитело-антиген является одним из наиболее важных этапов при проведении этапов ИФА. Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что все лунки полностью заполнены до верхнего края промывочным раствором во время каждого цикла промывки, этот промывочный раствор вносится с хорошим потоком, а также аспирация лунок между и после циклов промывки завершена и лунки пусты. Если в лунках осталась жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и промывайте с необходимым количеством циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендовано использовать режим работы со стрипами и режим промывки с переливом при объеме дозирования 800 мкл. Устройство для аспирации/промывки не следует оставлять на длительное время заполненным промывочным раствором, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому дозированию и аспирации жидкости.
5. Раствор HPR-субстрата TMB очень чувствителен к контаминации. Оптимально для сохранения стабильности реагента перенесите необходимое количество реагента из флакона в чистый резервуар или одноразовую пластиковую ванночку, для того чтобы избежать контаминации реагента. Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).
6. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику точного дозирования при работе с образцами и реагентами. Чтобы избежать переноса жидкости, не касайтесь наконечником пипетки поверхности стрипов и жидкости, для чего держите пипетку немного выше верхнего края лунки. Правильная техника дозирования имеет особое значение при внесении образцов и раствора TMB HPR-субстрата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
Промывочный раствор	2 недели при 2-25ºC в герметичном контейнере

Налейте 50 мл концентрата промывочного раствора в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз добавлением 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения забуференного промывочного раствора.

Раствор антител — 3 недели при 2-8ºC

Приготовьте нужный объем Раствора антител смешиванием 50 мкл раствора трейсера, HRP анти-АФП с 1 мл раствора биотинилированных анти-АФП антител на стрип (см. таблицу ниже и Протокол).

Кол-во стрипов	Трейсер, HRP анти-АФП (мкл)	Биотинилированные анти-АФП антитела (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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления раствора антител.

Другой вариант: Вылейте содержимое раствора трейсера, HRP анти-АФП во флакон с биотинилированными анти-АФП антителами и тщательно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера, HRP анти-АФП перенесен во флакон с биотинилированными анти-АФП антителами.

Замечание: Раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºC. Не готовьте его больше, чем требуется для анализа на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводите каждое измерение калибраторов, контролей и образцов пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Перед использованием все реагенты и образцы должны быть доведены до комнатной температуры (20-25ºC).

1. Начните с приготовления Промывочного буфера и Раствора Антител. Необходимо использовать только чистую посуду. Строго следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе (незамедлительно поместите неиспользуемые стрипы в пластиковый пакет с влагопоглотителем и плотно закройте его). Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте по 25 мкл калибраторов АФП (кал. 0, 5, 25, 100, 250, 500), контролей (К1, К2) и образцов пациентов (обр.) в лунки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. 0	кал. 250	обр. 1		
B	кал. 0	кал. 250	обр. 1		
C	кал. 5	кал. 500	обр. 2		
D	кал. 5	кал. 500	и т. д.		
E	кал. 25	К. 1			
F	кал. 25	К. 1			
G	кал. 100	К. 2			
H	кал. 100	К. 2			

4. Внесите по 100 мкл Раствора антител в каждую лунку, используя высокоточную пипетку на 100 мкл (или восьмиканальную высокоточную пипетку). Избегайте соприкосновения наконечников пипетки со стрипом или поверхностью жидкости и переноса реагента из лунки в лунку, удерживая пипетку чуть выше края лунки.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 5 минут) при комнатной температуре (20-25ºC) с постоянным встряхиванием планшета на шейкере.
6. Промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 ”Замечаний по процедуре анализа”.
7. Внесите 100 мкл HRP-субстрата ТМБ в каждую лунку, в той же последовательности, как и в п.4. Раствор HRP-субстрата ТМБ следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между внесением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
8. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным встряхиванием на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Немедленно считайте оптическую плотность на спектрофотометре при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано ниже.

Альт. 9. Добавьте 100 мкл стоп-раствора, Перемешайте. После этого в течение 15 минут после добавления стоп-раствора считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

С использованием набора CanAg AFP EIA можно измерить концентрации АФП в диапазоне от 0.5 до от 0,5 до 500 µг/л. Если концентрация АФП в образце выше ожидаемого диапазона измеряемых значений, образец рекомендуется развести человеческой сывороткой с низкой концентрацией АФП и проанализировать еще раз. **Замечание:** Сыворотка, используемая для разведения, тоже должна быть проанализирована для определения концентрации эндогенного АФП (см. “Расчет результатов”).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль качества
Поставляемые в наборе контроли АФП 1 и 2 могут быть использованы для ежедневного контроля качества исследований. Допустимые диапазоны указаны на этикетках флаконов. Если значения контролей не попадают в указанные диапазоны, необходимо полностью проверить все реагенты и характеристики ридера, и повторить анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сыворотки различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

Референсные материалы
В качестве референсного стандарта был использован 1й Международный Стандарт АФП IS 72/225.
Значения калибраторов и контролей АФП были прокалиброваны по наборам внутренних стандартов, соответствующих стандарту IS 72/225, значения внутренних стандартов конвертируются в стандарт IS 72/225 с использованием коэффициента 0.83, т. е., 1 µг/л соответствует 0.83 кМЕд/л.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ
Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию, указанную на этикетке к каждому калибратору АФП.
Для автоматического расчета результатов АФП рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 µг/л.
- Метод аппроксимации сглаженный сплайн. Калибратор 0 должен быть использован как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 µг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 µг/л.

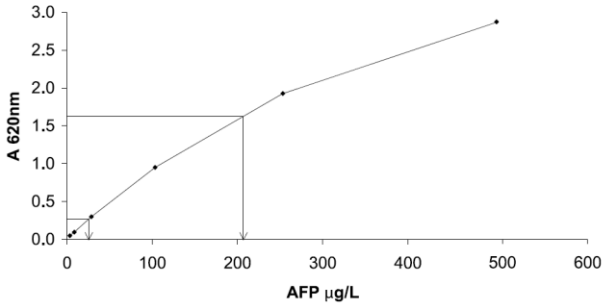
Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого калибратора против соответствующих концентраций АФП (в µг/л) (см. рисунок ниже). Значения концентраций АФП в образцах для каждого пациента находят по калибровочной кривой, используя среднюю оптическую плотность образца.
Если образец дает значение АФП больше 500 мкг/.л, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 и 1/100 нормальной человеческой сывороткой. Затем следует провести повторный анализ для получения точной концентрации АФП. Замечание: Образец, используемый для разведения, также необходимо исследовать для определения уровня АФП для определения эндогенной концентрации.

Концентрация АФП в неразбавленном образце вычисляется следующим образом:
Разведение 1/10:
$10 \times ([АФП]_{\text{разведенного образца}} - (0.9 \times [АФП]_{\text{нормальной сыворотки}}))$
Разведение 1/100:
$100 \times ([АФП]_{\text{разведенного образца}} - (0.99 \times [АФП]_{\text{нормальной сыворотки}}))$

Пример результатов

Образец	Значения калибраторов	Значения поглощения (А)	АФП мкг/.л
Калибратор АФП 0	0 мкг/.л	0.036	
Калибратор АФП 5	5 мкг/.л	0.083	
Калибратор АФП 25	25 мкг/.л	0.282	
Калибратор АФП 100	100 мкг/.л	0.938	
Калибратор АФП 250	250 мкг/.л	1.914	
Калибратор АФП 500	500 мкг/.л	2.854	
Образец А		0.220	19.4
Образец В		1.686	208



Пример (не используйте эту кривую или таблицу выше для определения фактических результатов)

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА
Уровни АФП не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, и набор АФП не должен использоваться для скрининга онкологических больных.
Результаты анализа должны интерпретироваться только в совокупности с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний, и АФП-тест не должен заменять другие клинические исследования.
Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), присутствующие в образцах сывороток пациентов, могут иногда влиять на результаты анализа, несмотря на то, что в буфер включен специфический блокирующий агент.
На результаты анализа может влиять биотин, давая ложные низкие результаты. Это необходимо учитывать при анализе образцов сывороток больных, получающих биологические добавки или терапию с высоким (> 5 мг в день) или очень высоким (300 мг в день) содержанием биотина. Максимальный уровень в сыворотке наблюдается через 1-3 часа после приёма, период полувыведения составляет приблизительно 8-16 часов, в зависимости от функции почек (8, 9). В исследовании авторов Grimsey et al. (8) показано, что концентрация биотина в образце достигла 30 нг/мл через 8 часов после приёма 10 мг биотина. Больным, получающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить приём биотина не менее, чем за 2 дня перед взятием крови (10).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрация АФП была определена у 40 практически здоровых мужчин и 93 практически здоровых женщин.

Было получено среднее значение 2.8 µг/л, при этом стандартное отклонение составило 2.6. Нижний и верхний пределы диапазона нормальных значений были рассчитаны с помощью рекомендованного IFCC непараметрического статистического метода. Доверительный интервал содержит центральную 95% фракцию референсного распределения. Соответственно, референсные границы могут быть установлены как 2.5% (нижний) и 97.5% (верхний) квантили. Эти границы отсекают фракцию 2.5% значений каждого конца референсного распределения.

Непараметрические расчеты:

фракция	**Референсный предел (µг/л)**	**90% доверительный интервал**
2.5th (нижний)	0.1	0.0–0.3
97.5th (верхний)	10	8.7–14.6

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений, так как он может варьировать в зависимости от таких факторов, как питание, климат, условия жизни, подборка пациентов, и т. д.

Так как показано, что уровень АФП повышается с возрастом, высказывается предположение об использовании возраст-зависимых референсных интервалов (2, 3). Необходимо также помнить, что базовая линия, полученная для каждого пациента, является наиболее информативной референсной точкой для интерпретации результата (3, 4).

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Точность

Точность была определена согласно руководству EP5-A NCCLS (6), с использованием 4 уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленный АФП в 9 различных комбинациях реагентов набора CanAg AFP EIA. Каждый образец был случайным образом пипетирован в дублях (n=2/ анализ), и проанализирован дважды в день, каждый день в течение 20 дней.

Образец	Реплики	среднее µг/л	SD, µг/л, внутри серии	CV внутри серии, %	SD, µг/л, между суткам и	CV между сутками, %
АФП 1	80	7.8	0.2	2.0	0.1	1.8
АФП 2	80	23.2	0.4	1.8	0.3	1.4
АФП 3	80	207	3.5	1.7	3.5	1.7
АФП 4	80	416	6.6	1.6	8.5	2.0

Предел определения

Предел определения для данного набора составил < 0.5 µг/л и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности нулевого калибратора АФП плюс 2 стандартных отклонения, и рассчитан по формуле:

$$\frac{2 \times SD\ CAL\ 0}{OD\ CAL\ 5 - OD\ CAL\ 0} \times 5\ мкг/л$$

Извлечение

Разбавленные образцы сыворотки были приготовлены добавлением аликвот образцов с высоким содержанием АФП к нормальным образцам сыворотки.

Извлечение добавленного антигена было найдено в диапазоне 90-106%. **Замечание**: Анализ извлечения нельзя проводить с использованием калибраторов данного набора.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 40 000 µг/л. Однако, так как у пациентов с прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномой могут быть чрезвычайно высокие уровни АФП, в образцах этих пациентов можно получить ложно низкие результаты за счет высокодозного Хук-эффекта. Чтобы избежать ошибочно низких результатов из-за Хук-эффекта высоких концентраций (особенно у пациентов, образцы которых исследуются в первый раз или когда предполагается высокая концентрация АФП), рекомендуется анализ образцов в двух разведениях (например, используйте для анализа неразведенный образец и образец, разведенный 1:100 нормальной сывороткой).

Линейность

Образцы сывороток пациентов были разведены нормальными сыворотками от здоровых людей и проанализированы. Полученные значения были в пределах ± 10% от ожидаемых значений.

Специфичность

CanAg AFP EIA основан на двух типах мышиных моноклональных антител, AFPK51 и AFPK57, распознающих два различных эпитопа на молекуле АФП (5).

В соответствии с руководством EP7-P NCCLS (9) было проведено исследование возможных источников интерференции. Следующие вещества были проверены в указанных концентрациях и показано, что они не оказывают значительной интерференции :

	Концентрации, не оказывающие значительного (± 10%) влияния на результаты
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин неконъюгированный	0.6 мг/мл
Гемоглобин	2 мг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 200 нг/мл. Средняя концентрация АФП была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. АФП с добавкой биотина / Средняя конц. АФП с добавкой только разбавителя).

Уровень АФП	Конц. биотина	Ожидаемая конц. АФП, Ед/мл	Наблюдаемая конц. АФП, Ед/мл	Извлечение, %
Низкая	15	22.5	222.4	99
Высокая	15	223	216	97
Низкая	30	22.5	22.4	100
Высокая	30	224	214	96
Низкая	60	23.1	20.6	89
Высокая	60	226	194	86
Низкая	200	22.8	5.28	23
Высокая	200	227	53.5	24
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 45 нг/мл.				

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Johnson, P.J, (2002) Tumor Markers in Primary Malignancies of the liver. In "Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications", ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washingon pp 269-276.
2. Stenman, U-H and Alfthan, H. (2002) Markers for Testicular Cancer.In "Tumor Markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications", ed. Dimandis E.P. AACC Press, Washingon, pp 351-359.
3. Christiansen, M., Hogdall, C.K., Andersen, J.R. and Norgaard-Pedersen, B. (2001) Alpha-fetoprotein in plasma and serum of healthy adults: preanalytical, analytical and biological sources of variation and construction of age-dependent reference intervals. *Scand J Invest* 61: 205-216.
4. Trapé, J., Botargues, J.M., Porta, F., Ricós, C., Badal, J.M., Salinas, R., Sala, M., and Roca, A. (2003) Reference change value for α-Fetoprotein and its application in early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatic disease. *Clin Chem* 49(7): 1209-1211.
5. Nustad, K., Paus, E., Kierulf, B., and Bormer, O.P. (1998) Specificity and affinity of 30 monoclonal antibodies against Alpha-Fetoprotein. *Tumor Biol* 19: 293-300.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
8. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
9. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
10. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

CanAg AFP EIA Prod. No. 600-10, 2019-07, F5632, r9

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg AFP EIA Кат. N 600-10

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Встряхивайте в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/Планшет	Действия
1. Приготовьте промывочный раствор	WASHBUF | 25X	Разбавьте 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды
Приготовьте раствор антител	CONJ | Anti-AFP BIOTIN | Anti-AFP	Смешать 50 мкл трейсера, HRP анти-АФП с 1 мл биотинилированных анти-АФП антител на стрип:
2. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку один раз промывочным раствором
3. Добавьте калибраторы, контроли и разбавленные образцы	Калибраторы 0, 5, 25, 100, 200, 500 CAL | AFP Контроли 1, 2 CONTROL | AFP	25 мкл в каждую лунку
4. Добавьте раствор антител	Рабочий раствор антител	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре
6. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку 6 раз промывочным раствором
7. Добавление ТМБ HRP-субстрата	SUBS | TMB	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
9. Считывание оптической плотности	MICROPLA	620 нм
Альт. 9 Добавьте стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую лунку
Аль. 10 Инкубация	MICROPLA	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
Аль. 11. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считать при 405 нм в течение 15 минут

№ стрипа	Трейсер HRP анти-АФП мкл	Биотинил. антитела, 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg S100 EIA

Кат. N 708-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

CE

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения


Использовать до



Номер лота


Дата производства



Только для диагностики In Vitro



Номер по каталогу



Температурный режим



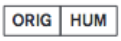
Содержит достаточные количества для «96» определений


Обратитесь к инструкции по применению



Компоненты набора

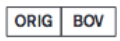

Биологическая опасность



Человеческого происхождения



Мышиного происхождения



Крупного рогатого скота


Растворить в


Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg S100 EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор CanAg S100 EIA предназначен для количественного определения белка S100B (S100A1B + S100BB) в сыворотке.

Введение и объяснение метода

S100 – это белок с молекулярной массой 20 кДа, принадлежащий S100/кальмодулин/тропонин С суперсемейству EF-рука-кальций связывающих белков. Впервые S100 был выделен из тканей мозга человека, и считался белком, специфическим для глиальных клеток (1). К настоящему времени, основываясь на структурном или функциональном подобиях, охарактеризовано 20 мономеров, принадлежащих семейству S100 (2, 3). Большая часть белков семейства S100 существует в форме димеров, специфичных для разных клеток. Два из S100 мономеров, обозначаемые как S100A1 и S100B (4) очень консервативны между видами и обнаруживаются как в виде гомодимеров (BB), так и в форме гетеродимеров (A1B), в основном в глиальных клетках нервной системы, а также в некоторых периферических клетках, например, шванновских клетках, меланоцитах, адипоцитах, хондроцитах (5).
Обе формы белка, S100A1B и S100BB, присутствуют в тканях злокачественных образований, наиболее выражено их присутствие в ткани злокачественной меланомы, в меньшей степени - в глиоме, клетках карциномы щитовидной железы и почки (2).
Показано, что определение S100B в сыворотке может быть использовано для прогноза и мониторинга лечения пациентов с диагностированной злокачественной меланомой (6-9). Кроме того, исследования показали, что измерения концентрации белка S100B могут давать полезную информацию при ведении пациентов с повреждениями тканей головного мозга, например, при травмах головы, перинатальной асфиксии, остановке сердца, инсульте и кардиохирургии (10-13).

Принцип метода

Настоящий набор CanAg S100 EIA является твердофазным двушаговым неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на использовании двух видов мышиных моноклональных антител, специфически распознающих два разных эпитопа молекулы S100B. Метод определяет обе формы: S100A1B и S100BB, без перекрестной реактивности с другими формами S100.
Калибраторы и образцы сывороток пациентов инкубируются вместе с биотинилированными

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

моноклональными антителами к S100B (MAb) S23 в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. В процессе инкубации S100B, присутствующий в образцах и калибраторах, связывается в покрытых стрептавидином лунках с биотинилированными моноклональными антителами к S100B. Затем лунки промываются, и инкубируются с моноклональными антителами к S100B (MAb) S53, мечеными пероксидазой хрена (HRP). После промывки в каждую лунку добавляется забуференный раствор субстрат/хромогена (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству S100B, присутствующего в образце.

Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре с фильтром 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).

Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация S100B в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg S100 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при +2 - +8ºC. Не замораживайте.
- Стабильность реагентов после вскрытия указана в таблице, при условии, что реагенты не были загрязнены, хранятся в оригинальных тщательно закрытых флаконах и используются так, как это описано в данной инструкции. После использования немедленно вернуть в холодильник при 2-8°C.

Компонент	Количество	Хранение, срок годности
MICROPLA **Микропланшет**	1 планшет	2-8ºC, до истечения срока годности, указанного на планшете
12x8 лунок, покрытых стрептавидином. Неиспользованные стрипы сразу вернуть в алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закрыть, хранить сухим.		
Калибраторы S100B CAL | S100 | A CAL | S100 | B CAL | S100 | C CAL | S100 | D CAL | S100 | E CAL | S100 | F	6 флаконов, лиофилизированные 1 x 1 мл 1 x 1 мл 1 x 1 мл 1 x 1 мл 1 x 1 мл 1 x 1 мл	4 недели при 2-8ºC, 3 месяца при –30° C или ниже
Лиофилизированные калибраторы содержат бычий S100B в протеиновом матриксе с 0.02% NaN3 в качестве консерванта. Должны быть растворены водой перед использованием. ЗАМЕЧАНИЕ: Точная концентрация S100B специфична для каждого лота и указана на этикетке каждого флакона.		
BIOTIN | Anti-S100 **Биотинилированные анти-S100 антитела**	1 x 15 мл	2-8ºC, до истечения срока годности, указанного на флаконе
Биотинилированные анти-S100 моноклональные мышиные антитела, ≈ 2 мкг/мл. Содержит фосфатно-солевой буфер (pH 7.2), $CaCl_2$, бычий сывороточный альбумин, бычий иммуноглобулин, блокирующие агенты, Tween-20, инертный синий краситель и 0.01% метилизотиазолон (MIT) в качестве консерванта. Готов к использованию.		
CONJ | Anti-S100 **Трейсер, HRP-анти-S100**	1 x 0.75 мл	2-8ºC, до истечения срока годности, указанного на флаконе
Сток-раствор мышиных анти-S100 моноклональных антител, меченных пероксидазой хрена, ≈ 20 мкг/мл. Содержит консерванты. Должен быть разбавлен перед использованием буфером для разведения трейсера.		
DIL | CONJ **Буфер для разведения трейсера**	1 x 15 мл	2-8ºC, до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит фосфатно-солевой буфер (pH 7.2), бычий сывороточный альбумин, блокирующие агенты, детергенты, инертный синий краситель, и 0.01% метилизотиазолон (MIT) в качестве консерванта. Готов к использованию.		
SUBS | TMB **ТМБ HRP-субстрат**	1 x 12 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3,3`,5,5` тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.		
STOP **Стоп-раствор**	1 x 15 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит 0.12 М соляную кислоту. Готов к использованию.		
WASHBUF | 25X **Концентрат промывочного буфера**	1 x 50 мл	2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Содержит забуференный Tris-HCl солевой раствор с Tween-20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой.		

Показатели нестабильности

Раствор ТМВ - HRP-субстрата должен быть бесцветным или слегка голубоватым. Более темное голубое окрашивание свидетельствует о том, что реагент был загрязнен и должен быть выброшен.

Предупреждения и меры предосторожности

Набор предназначен только для диагностики *in vitro.*

- Только для профессионального использования
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или другими региональными или национальными руководствами.
- Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Реагенты содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Азид натрия может реагировать с медью и свинцом водопроводных труб с образованием взрывчатых азидов металлов. При утилизации реагентов смывайте их большим количеством воды для предотвращения накопления азидов.
• Соблюдайте местные инструкции по утилизации всех отходов.

Сбор и подготовка образцов
Набор CanAg S100 EIA разработан для использования сыворотки. Соберите кровь венепункцией, отделите сыворотку стандартной процедурой.
Образцы могут храниться при 2–8°C в течение 24 часов. Для более длительного хранения образцы необходимо хранить при температуре -20ºC или ниже. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять, желательно при 2-8ºC в течение ночи, и затем дайте образцам достичь комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА
Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки
1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным. Продольное встряхивание около 200 ударов/мин, 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если нет автоматического промывающего устройства, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный ридер
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна..
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Необходима для растворения калибраторов S100 и приготовления буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа
1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию к набору и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое.
   Не смешивайте идентичные реагенты из наборов разных лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, указанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-28ºC). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-28ºC. Замороженные образцы необходимо должны быть доведены до комнатной температуры и после оттаивания осторожно и тщательно перемешать.
3. Перед внесением калибраторов и образцов пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов твердофазное антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
   Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендуется использовать режим промывки стрип и режим overflow с объемом 800 мкл. Нельзя надолго оставлять устройство для аспирации/промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться, что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
5. ТМБ-субстрат очень чувствителен к контаминации. Для оптимальной стабильности субстрата ТМБ убедитесь в том, что вы используете чистый сосуд или предпочтительно одноразовую пластиковую ванночку и чистые одноразовые пластиковые наконечники (или наконечники для диспенсеров).
6. Убедитесь, что Вы используете только чистые одноразовые наконечники и правильную технику дозирования во время внесения образцов и реагентов. Избегайте контаминации между лунками, держа пипетку чуть выше края лунки, и избегайте прикосновения к стрипу или поверхности жидкости в лунке. Это особенно важно при работе с субстратом ТМБ.

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
Калибраторы S100	4 недели при 2-8ºC 3 месяца при –30° C или ниже

Внесите точно по 1.0 мл дистиллированной воды в каждый флакон и аккуратно перемешайте. Оставьте растворяться не менее, чем на 15 минут.
ЗАМЕЧАНИЕ: Концентрации калибраторов указаны на этикетках флаконов и должны быть использованы для расчета результатов.

Буфер для промывок	2 недели при +2-+25ºC в закрытом контейнере

Налейте 50 мл концентрата буфера для промывок в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз, добавив 1200 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной или деионизированной воды для получения рабочего раствора буфера для промывок.

Рабочий раствор трейсера 3 недели при +2-+8ºС в закрытом контейнере

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера, смешав 50 мкл трейсера, HRP анти-S100, с 1 мл буфера для разведения трейсера на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Трейсер, HRP анти-S100, мкл	Буфер для разведения 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

Убедитесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с раствором трейсера (HRP анти-S100) во флакон с буфером для разведения трейсера и осторожно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера перенесен во флакон с буфером для разведения трейсера.

Замечание: Рабочий раствор трейсера стабилен 3 недели при хранении при 2-8ºС. Не готовьте его больше, чем требуется, на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводите каждое определение калибраторов и образцов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа . Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (20–25°С) перед использованием.

1. Начните с приготовления калибраторов S100, буфера для промывок и рабочего раствора трейсера. Очень важно использовать чистые контейнеры. Тщательно следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество микрострипов в держателе. (сразу верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно закройте его.) Промойте каждый стрип один раз буфером для промывок. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Внесите по 50 мкл калибраторов S100 (кал. A, B, C, D, E, F) и образцов сывороток пациентов (обр.) в лунки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. A	кал. E	и т. д.		
B	кал. A	кал. E			
C	кал. B	кал. F			
D	кал. B	кал. F			
E	кал. C	обр. 1			
F	кал. C	обр. 1			
G	кал. D	обр. 2			
H	кал. D	обр. 2			

4. Добавьте по 100 мкл биотинилированных анти-S100 антител в каждую лунку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкости, удерживая наконечники чуть выше верхнего края лунок при дозировании, и избегайте касания наконечниками стрипов или поверхности жидкости.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 2 часа (± 10 минут) при комнатной температуре (20-25ºС) с постоянным встряхиванием планшета на шейкере.
6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 ”Замечаний по процедуре анализа”.
7. Добавьте по 100 мкл рабочего раствора трейсера в каждую лунку, соблюдая ту же технику дозирования, как в шаге 4.
8. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 5 минут) при комнатной температуре (20-25ºС) с постоянным встряхиванием планшета на шейкере.
9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип по 6 раз, как описано в п. 4 ”Замечаний по процедуре анализа”.
10. Добавьте по 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку в той же последовательности, как в шаге 4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным встряхиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
12. Немедленно считайте оптическую плотность с помощью микропланшетного спектрофотометра при длине волны 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет микропланшетного спектрофотометра с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано ниже:

Альт. 12. Добавьте по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

Набор CanAg S100 EIA предназначен для измерения в диапазоне концентраций 10 – 3500 нг/л. Если концентрация S100B в образце больше 3500 нг/л, необходимо развести его нормальной человеческой сывороткой перед анализом. **ЗАМЕЧАНИЕ**: Сыворотку, используемую для разведения, также необходимо проанализировать вместе с образцом, для определения уровня эндогенного S100B (см. «Расчет результатов»)

Контроль качества

Контрольные сыворотки CanChek Tumor Marker Control Sera уровни 1 и 2 (заказываются отдельно, кат. № 107-20) рекомендуются для оценки достоверности результатов анализа. Если получаемые для контрольных сывороток значения не попадают в диапазон допустимых значений, специфичный для контрольных сывороток, необходимо провести полную проверку реагентов и оборудования и повторить анализ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контрольные материалы.
Так как не существует Международных стандартов для S100A1B или S100BB, набор калибраторов CanAg S100, поставляемый в наборе, прокалиброван по внутренним референсным стандартам производителя.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, то следуйте инструкции к ридеру и создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора S100.
Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод построения кривой кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 нг/л.
- Метод построения кривой гладкий сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 нг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 нг/л.

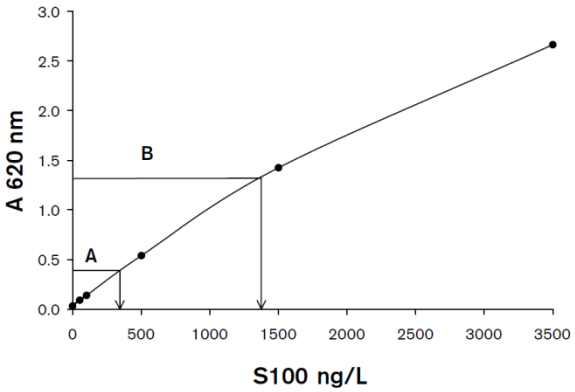
Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (A), полученных для каждого калибратора, против соответствующих концентраций S100 (в нг/л) (см. рисунок ниже). Значения концентраций S100 в образцах для каждого пациента находят по калибровочной кривой, используя средние значения оптической плотности образца.

Если образец дает значение S100 больше, чем самый высокий калибратор F (3500 нг/л), то его необходимо разбавить его в соотношении 1/10 нормальной человеческой сывороткой и проанализировать еще раз для получения точного значения концентрации S100.
ЗАМЕЧАНИЕ: В сыворотке, используемой для разведения, также необходимо определить уровень S100 для определения эндогенной концентрации.
В этом случае концентрация S100 в исходном образце рассчитывается следующим образом:
Разведение 1:10 :
$10 \times ([S100]_{\text{разведенного образца}} - (0.9 \times [S100]_{\text{нормальной сыворотки}}))$

Пример результатов

Образец	Значения калибраторов	Значения поглощения (A)	S100 нг/л
Калибратор A	0 нг/л	0.041	
Калибратор B	50 нг/л	0.091	
Калибратор C	100 нг/л	0.139	
Калибратор D	500 нг/л	0.540	
Калибратор E	1500нг/л	1.425	
Калибратор F	3500 нг/л	2.663	
Образец A		0.352	305
Образец B		1.377	1435



Пример (не используйте эту кривую или таблицу выше для определения результатов)

Ограничения метода

Уровень S100 не должен быть использован как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественного заболевания, тест S100 не должен использоваться для скрининга рака. Результаты анализа должны интерпретироваться в совокупности с результатами других исследований и процедур, проводимых при постановке диагноза и при мониторинге пациентов, и данный тест S100 не должен заменять какое-либо установленное клиническое обследование.
Повышение концентрации S100B в сыворотке необходимо интерпретировать с осторожностью в образцах сыворотки пациентов с травмами, такими как переломы костей, ожоги, внутренние повреждения мягких тканей, после хирургических операций, так как эти состояния связаны со значительным высвобождением S100B (14).
Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), которые могут присутствовать в образцах сывороток пациентов, могут иногда влиять на результаты анализа, несмотря на то, что в буфер добавлены блокирующие агенты.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (18, 19). В исследовании Grimsey и др. (18) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (20).

Ожидаемые значения

Уровень S100B был измерен у 269 здоровых доноров крови. С использованием рекомендованного IFCC непараметрического статистического метода обработки были определены максимальное и минимальное значения для нормального диапазона. Доверительной интервал содержит центральную 95% фракцию распределения. Верхняя граница доверительного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

интервала может быть соответственно оценена 97.5% (верхний) квантиль. Непараметрическая оценка:

	Среднее, нг/л	SD, нг/л	Верхняя референсная граница
Здоровые доноры крови n=269	54	15.6	90 нг/л

Рекомендуется каждой лаборатории установить свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких, как питание, климат, условия жизни, отбор пациентов и т. д.

Характеристики набора

Точность

Общая точность была рассчитана согласно руководству NCCLS EP5-A (15) с использованием четырех уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленный S100 при 22 различных комбинациях реагентов набора CanAg S100 EIA. Каждый образец был случайным образом дозирован (n=2/постановку) и проанализирован дважды в день в течение 20 дней.

образец	реплики	среднее (нг/л)	SD внутри серии (нг/л)	CV внутри серии, %	SD между сутками (нг/л)	CV между сутками %
S100 1	80	70	2	2.5	2	2.2
S100 2	80	302	5	1.6	8	2.5
S100 3	80	1440	20	1.4	21	1.5
S100 4	80	2260	30	1.3	85	2.0

Предел обнаружения

Предел обнаружения для данного набора CanAg S100 EIA составил ≤ 10 нг/л и определен как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого калибратора плюс 2 стандартных отклонения, согласно формуле:

$$\frac{2 \times SD\ CAL\ A}{OD\ CAL\ B - OD\ CAL\ A} \times [CAL\ B]\ нг/л$$

Где OD – оптическая плотность, CAL – калибратор.

Извлечение

Обогащенные образцы сыворотки были приготовлены добавлением антигена человеческого S100 к нормальным образцам сыворотки. Извлечение антигена было найдено в диапазоне 97–105%.

ЗАМЕЧАНИЕ Исследования на определение извлечения не должны проводиться с использованием калибраторов, поставляемых с набором.

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 150 000 нг/л.

***Замечание*:** в пробах с очень высокой концентрацией цвет субстрата изменяется с голубого на зеленоватый (и даже желтый при очень высоких концентрациях). Это приводит к ложно низкой оптической плотности при 620 нм, и в экстремальных случаях оптическая плотность может снижаться до значений в пределах калибровочной кривой, что может отмечаться как Хук-эффект.

Линейность

Образцы пациентов были разбавлены нормальной сывороткой и проанализированы. Полученные значения были в пределах ± 10% от ожидаемых значений.

Специфичность:

Метод CanAg S100 EIA основывается на двух различных типах мышиных моноклональных антител: захватывающие антитела MAb S23 и детектирующие антитела MAb S53, каждый из них имеет свой специфический эпитоп для связывания на молекуле S100B.

С помощью данного набора определяются S100A1B и S100BB без перекрестной реактивности с другими формами S100.

Руководство NCCLS EP7-P (16) рекомендует проверять возможные источники интерференции. Были проверены следующие вещества в указанных концентрациях и показано отсутствие влияния на результаты анализа:

	Концентрации, не оказывающие значительной интерференции (± 10%)
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин, неконъюгированный	0.6 мг/мл
Гемоглобин	3.9 мг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 6, 15, 30 и 60 нг/мл. Средняя концентрация S100 была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. S100 с добавкой биотина / Средняя конц. S100 с добавкой только разбавителя).

Уровень S100	Конц. Биотина, нг/мл	Ожидаемая конц. S100, нг/мл	Наблюдаемая конц. S100, нг/мл	Извлечение, %
Низкая	6	136	133	97
Высокая	6	608	599	98
Низкая	15	138	129	94
Высокая	15	620	582	94
Низкая	30	133	113	84
Высокая	30	632	540	85
Низкая	60	134	87.0	65
Высокая	60	659	416	63
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 20 нг/мл				

Сравнение методов

Метод CanAg S100 EIA был сравнен с методом Sangtec 100. Были проверены 98 образцов человеческой сыворотки от пациентов со злокачественной меланомой, диапазон значений составил 0-8000 нг/л, линейный регрессионный анализ дал следующие результаты:

CanAg S100 = 0.4 x Sangtec 100 + 0.03 r =0.99

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература:

1. Beiberthaler P et al., (2006) Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury *Shock* 25:446-453.
2. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
3. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
4. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins:structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
5. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
6. Takahashi K et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
7. Banfalvi T et al., (2003) Use of serum 5-S-CD and S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
8. Djureen-Mårtensson E, et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. J Clin Oncol 19:824-831.
9. Hauschild A et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
10. Wunderlich MT et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
11. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ishemia. *Stroke* 29:2363-2366.
12. Rosén H et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
13. Ingebrigtsen T et al.,(2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicentre study. *Brain Inj* 14:1047-1055.
14. Michetti F and Gazzolo D (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104.
15. Anderson R et al., (2001) High serum S100B levels for trauma patients without head injuries *Neurosurgery* 48:1255-1258.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).
18. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
19. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
20. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg **S100 EIA 708-10**

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	**Флакон/Планшет**	**Действия**
1. Приготовьте калибраторы S100	CAL | S100 A, B, C, D, E, F	Внесите точно по 1.0 мл дистиллированной воды в каждый флакон и аккуратно перемешайте. Оставьте растворяться не менее, чем на 15 минут. **ЗАМЕЧАНИЕ:** Точная концентрация каждого калибратора указана на этикетках флаконов. **Стабильность после растворения:** 4 недели при 2-8ºC
Приготовьте промывочный раствор	WASHBUF | 25X	Разбавьте 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды.
Приготовьте рабочий раствор Трейсера	CONJ | Anti-S100 DIL | CONJ	Для одного стрипа смешайте 50 мкл трейсера HRP Anti-S100 с 1 мл буфера для разведения трейсера: **Кол-во стрипов / Трейсер мкл / Разбавитель 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
2. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку один раз промывочным раствором, вручную или используя автоматический вошер
3. Добавьте калибраторы и образцы	CAL | S100 A, B, C, D, E, F	50 мкл в каждую лунку
4. Добавьте раствор биотинилированных анти-S100 антител	BIOTIN | Anti-S100	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	MICROPLA	2 часа, встряхивая на шейкере при комнатной температуре
6. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку 3 раза промывочным раствором, вручную или используя автоматический вошер
7. Добавьте рабочего раствора трейсера	**Рабочий раствор трейсера**	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая на шейкере при комнатной температуре
9. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку 6 раз промывочным раствором, вручную или используя автоматический вошер
10. Добавьте TMB HRP-субстрата	SUBS | TMB	100 мкл в каждую лунку
11. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая на шейкере при комнатной температуре
12. Считывание оптической плотности	MICROPLA	620 нм
Альтернативный вариант:		
12. Добавьте стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую лунку
13. Инкубация	MICROPLA	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
14. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считайте при 405 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CanAg SCC EIA

Кат. N 800-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
	Человеческого происхождения
ORIG HUM	
	Мышиного происхождения
ORIG MOU	
	Крупного рогатого скота
ORIG BOV	
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CanAg SCC EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

ВНИМАНИЕ! Важная информация для пользователей: антиген плоскоклеточной карциномы (SCC) присутствует в коже, поте и слюне, и легко попадает в аэрозоли, например, в результате чихания. Для предотвращения контаминации и получения ложноположительных результатов необходимо обязательно использовать перчатки без талька с момента вскрытия упаковки и в течение всей процедуры: при работе с флаконами с реагентами, при работе с микропланшетом, наконечниками и т.д. Кроме того, все полученные повышенные значения должны быть подтверждены повторным анализом.

Назначение

Настоящий набор CanAg SCC EIA предназначен для количественного определения SCC-антигена (антигена плоскоклеточной карциномы) в сыворотке в качестве вспомогательного средства при ведении пациентов с плоскоклеточной карциномой..

Введение и объяснение метода

Антиген плоскоклеточной карциномы (SCC-AG) – это группа гликопротеинов с молекулярной массой около 45 кДа, принадлежащих к семейству ингибиторов сериновых/цистеиновых протеаз (1). Первоначально белок был выделен Kato и его сотрудниками из ткани плоскоклеточной карциномы человека, при этом было обнаружено как минимум 10 субфракций с различными изоэлектрическими точками (2). Более поздние исследования показали, что SCC-AG состоит из продуктов двух различных, но высокогомологичных генов, SCCA1 и SCCA2, с различной специфичностью ингибиторной активности (3).
Антиген SCC является серологическим маркером для плоскоклеточных карцином различных локализаций – шейки матки, вульвы, легких, головы и шеи, пищевода (4-6). При плоскоклеточном раке шейки матки, уровень SCC-антигена до начала лечения может быть использован как независимый прогностический фактор на ранних стадиях заболевания (7). Кроме того, определение уровня SCC-антигена до начала лечения показано для выявления группы пациентов с высоким риском для адъювантной терапии (4). Более того, у пациентов, имевших повышенный уровень SCC-антигена до начала лечения, концентрация антигена коррелирует с эффективностью проводимого лечения, радио- и химиотерапии. Таким образом, измерение уровня SCC-антигена может быть использовано для мониторинга эффективности проводимого лечения и для раннего (доклинического) выявления рецидивов (4).

Принцип метода

Настоящий набор CanAg SCC EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич”-технологии. В покрытых стрептавидином лунках микропланшета калибраторы и образцы пациентов инкубируются вместе

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

с биотинилированными моноклональными антителами к SCC-антигену и антителами к SCC антигену, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). После промывки в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3,5,5-тетраметилбензидин), обеспечивая ферментную реакцию. В процессе этой реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена SCC, присутствующему в образце.
Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм (или возможно при 405 нм после добавления стоп-раствора). Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация SCC антигена в образцах крови пациентов рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CanAg SCC EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на внешней этикетке коробки набора
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов и наборов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте.
- Стабильность вскрытых реагентов при условиях отсутствия загрязнения, хранения в оригинальных плотно закрытых контейнерах и строго соответствующего инструкции использования, указана в таблице. После использования немедленно верните реагенты в холодильник для хранения при 2-8ºC.
-

Компонент	Количество	Срок годности и хранение после вскрытия
MICROPLA **Микропланшет**	1 планшет	При 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет, содержащий осушитель. Тщательно закройте пакет. Храните сухим.

Калибраторы SCC 5 флаконов, Лиофилизированные 4 недели при 2-8ºC, 3 месяца при -20 ºC

CAL	SCC	A	1x 0.75 мл
CAL	SCC	B	1x 0.75 мл
CAL	SCC	C	1x 0.75 мл
CAL	SCC	D	1x 0.75 мл
CAL	SCC	E	1x 0.75 мл

Лиофилизированные калибраторы содержат человеческий SCC в Tris-HCl буфере, с добавлением бычьего сывороточного альбумина, наполнителя, инертного желтого красителя и 0.01% метилизотиазолина (MIT) в качестве консерванта. Растворите перед использованием водой. **ЗАМЕЧАНИЕ:** точные концентрации SCC указаны на этикетках флаконов и могут изменяться от лота к лоту.

BIOTIN Anti-SCC

Биотинилированные моноклональные антитела к SCC антигену 1 x 15 мл при 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Биотинилированные анти-SCC мышиные моноклональные антитела, приблизительно 1 мкг/мл, в фосфатном буфере (pH 7.2), содержащем бычий сывороточный альбумин, бычий иммуноглобулин, блокирующие вещества, детергенты, инертный голубой краситель и 0.01% метилизотиазолина (MIT) в качестве консерванта. Должен быть смешан перед использованием с Трейсером с пероксидазой хрена (HRP) с анти-SCC.

CONJ Anti-SCC

Трейсер HRP анти-SCC 1 x 0.75 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе

Сток-раствор конъюгата мышиных моноклональных антител к SCC антигену с пероксидазой хрена, приблизительно 40 мкг/мл. Содержит консерванты. Должен быть смешан перед использованием с биотинилированными моноклональными антителами к SCC антигену.

SUBS TMB

Субстрат ТМБ 1 x 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе

Содержит забуференный раствор перекиси водорода и , 3 ', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ). Готов к использованию.

STOP

Стоп-раствор 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе

Содержит 0.12 М соляную кислоту. Готов к использованию.

WASHBUF 25X

Концентрат 25x промывочного раствора 1 x 50 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Tris-HCl буферный раствор, содержащий Твин 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разбавлен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности

Субстрат ТМБ должен быть бесцветным или слабо голубоватым. Голубая окраска свидетельствует о том, что реагент разложился и его следует выбросить.

Предупреждения и меры предосторожности

- **Для диагностики *in vitro***
- Набор предназначен только для профессионального использования.
- Пожалуйста, ознакомьтесь с публикацией № (CDC) 88-8395 Министерства здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США) по лабораторной безопасности или местными или национальными инструкциями.
- Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Следуйте региональным руководствам по хранению и утилизации отходов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сбор и подготовка образцов

Набор CanAg SCC EIA разработан для использования сыворотки. Соберите кровь из вены методом венепункции, отделите сыворотку стандартными процедурами. Образцы могут храниться при +2-+8ºС в течение одного дня.

Для более длительного хранения аликвот образцов рекомендуется -70ºС или ниже. Избегайте повторного замораживания-размораживания образцов. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8ºС в течение ночи и затем позвольте достичь образцам комнатной температуры перед анализом.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если нет автоматического промывающего устройства, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна.
5. Дистиллированная или деионизированная вода. Требуется для растворения калибраторов SCC-антигена и для приготовления промывочного раствора.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов.

   Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры (20-25ºС). Замороженные образцы должны быть доведены до комнатной температуре и после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны вручную. **Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºС.**
3. Перед внесением калибраторов и образцов пациентов в лунки рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
   Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   Автоматическая промывка (с использованием вошера): Следуйте инструкциям производителя прибора по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендуется использовать режим strip и overflow с объемом 800 мкл. Нельзя надолго оставлять устройство для аспирации/промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут , что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
5. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к загрязнению. Для лучшей стабильности TMB HRP-субстрата, чтобы избежать загрязнения реагента налейте необходимое количество реагента из флакона в тщательно очищенный резервуар или, предпочтительно, в одноразовую пластиковую ванночку. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).
6. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику дозирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте переноса материала из лунки в лунку, для этого не прикасайтесь к поверхности жидкости. Правильный метод дозирования имеет особое значение при работе с раствором субстрата TMB.

Приготовление реагентов	**Стабильность приготовленных реагентов**
Калибраторы SCC	4 недели при 2-8^{O}C 3 месяца при -20 ^{O}C или ниже

Добавьте 0.75 мл дистиллированной воды в каждый флакон и аккуратно перемешайте. Оставьте не менее, чем на 15 минут. Замечание: точная концентрация каждого калибратора указана на этикетке флакона и должна использоваться для расчета результатов

Промывочный раствор	2 недели при 2-25^{O}C в закрытом контейнере

Для получения готового промывочного буфера перенесите 50 мл концентрата промывочного раствора в чистый контейнер и разбавьте в 25 раз, добавив 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды

Раствор антител	3 недели при 2-8^{O}C

Приготовьте необходимое количество раствора антител, смешивая 50 мкл трейсера, HRP анти-SCC с 1 мл биотинилированных анти-SCC антител следующим образом (см. таблицу и протокол ниже):

Кол-во стрипов	**Трейсер, HRP анти-SCC, мкл**	**Биотин анти-SCC, мл**
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые или стеклянные флаконы при приготовлении рабочего раствора антител.

Альтернативно: Перелейте содержимое флакона с Трейсером (HRP Anti-SCC) во флакон с биотинилированными анти-SCC антителами и аккуратно перемешайте. Убедитесь, что весь трейсер (HRP Anti-SCC) перенесен во флакон с биотинилированными анти-SCC-антиген антителами.

ВНИМАНИЕ: Раствор антител стабилен в течение 3 недель при 2-8^{O}C. Не готовьте большее количество раствора, чем будет использовано в этот период. Убедитесь в правильном хранении приготовленного раствора.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводите каждое исследование калибраторов и образцов пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Все реагенты и образцы должны быть доведены до комнатной температуры перед анализом (20-25ºC).

1. Начните с приготовления калибраторов SCC, промывочного буфера и рабочего раствора антител. Важно использовать чистые контейнеры. Строго следуйте инструкции.
2. Закрепите требуемое количество стрипов в рамке-держателе. (немедленно верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и закройте его.) Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Добавьте 25 мкл калибраторов SCC (кал. A, B, C, D, E) и образцов пациентов (обр.) в лунки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. A	кал. E			
B	кал. A	кал. E			
C	кал. B	обр. 1			
D	кал. B	обр. 1			
E	кал. C	обр. 2			
F	кал. C	обр. 2			
G	кал. D	и т. д.			
H	кал. D				

4. Добавьте 100 мкл раствора антител в каждую лунку, используя одно- или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкости в соседние лунки за счет высокого расположения наконечников при дозировании и избегайте касания стрипов или поверхности жидкости наконечниками.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (± 5 минут) при комнатной температуре (20-25ºC) с постоянным шейкированием планшета на микропланшетном шейкере.
6. Промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 "Замечаний по протоколу анализа".
7. Добавьте 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку в той же последовательности, как в п.4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
8. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным шейкированием планшета. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Возможный вариант:

Если в лаборатории нет микропланшетного спектрофотометра с длиной волны 620 нм, абсорбция может быть определена следующим образом:

Алт. 9. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

Данный набор CanAg SCC EIA позволяет измерить концентрации в диапазоне 0.3 – 50 µг/л. Если ожидаемая концентрация SCC превышает измеряемый диапазон, рекомендуется разбавить образец нормальной человеческой сывороткой перед анализом.

ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотка, используемая для разведения, также должна быть проанализирована для определения концентрации эндогенного SCC-антигена (см. «Расчет результатов»).

Контроль качества

Контроли CanChek Tumor marker Control Sera Уровень 1 и 2 (заказываются отдельно, кат. номер REF 107-20) рекомендованы для оценки достоверности результатов анализа. Если получаемые для контрольных сывороток значения не укладываются в указанные на флаконах диапазоны, необходимо полностью проверить все используемые реагенты и ридер, провести анализ еще раз.

Контрольные материалы

Так как не существует общедоступных контрольных материалов для SCC-антигена, калибраторы SCC-антигена, поставляемые в данном наборе, калиброваны по серии внутренних референс-стандартов производителя.

Расчет результатов

Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора SCC-антигена.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод построения кривой кубический сплайн. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 µг/л.
- Метод построения кривой гладкий сплайн. Калибратор 0 должен использоваться как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 µг/л.
- Квадратичная регрессия. Калибратор 0 должен быть включен в кривую со значением 0 µг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для расчета результатов вручную постройте калибровочную кривую, используя значения оптической плотности (A), полученные для каждого калибратора против соответствующих концентраций SCC (в мкг/л) (см. рисунок ниже). Неизвестные концентрации образцов можно определить исходя из калибровочной кривой, используя среднее значение абсорбции для каждого образца.

Если концентрация исследуемого образца превышает 50 µг/л, образец должен быть разбавлен нормальной

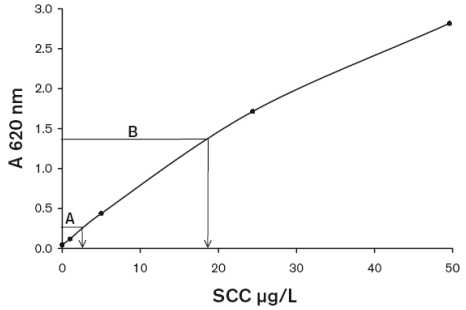
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

человеческой сывороткой 1/10 и проанализирован еще раз для определения точной концентрации SCC-антигена. ЗАМЕЧАНИЕ: Сыворотка, используемая для разведения, также должна быть проанализирована, для определения концентрации эндогенного SCC-антигена
Концентрация SCC-антигена в разведенных образцах рассчитывается по формуле:
Разведение 1/10:

$$10 \times ([SCC]_{\text{разведенного образца}} - (0.9 \times [SCC]_{\text{образца, использованного для разведения}}))$$

Пример результатов:

Образец	Концентрация калибратора	Среднее значение ОП (А)	Концентрация SCC, µг/л
CAL SCC A	0 µг/л	0.043	
CAL SCC B	1 µг/л	0.119	
CAL SCC C	5 µг/л	0.437	
CAL SCC D	24 µг/л	1.715	
CAL SCC E	50 µг/л	2.818	
Образец А		0.245	2.6
Образец В		1.363	18.3



Пример (не используйте эту кривую для определения результатов)

Ограничения метода:
SCC-антиген присутствует в клетках нормального плоского эпителия, повышенный уровень SCC-антигена может выявляться при кожных заболеваниях при процессах гиперкератинизации, например, при псориазе или экземе. Повышение уровня антигена может также происходить при доброкачественных заболеваниях - при воспалительных заболеваниях легких и печени, при почечной недостаточности (4, 9).
Следовательно, уровень SCC-антигена не может быть использован как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественного заболевания, тест на определение SCC не должен использоваться при скрининге. Результаты анализа должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний и SCC-тест не должен замещать другие клинические исследования.
SCC-антиген присутствует в коже, поте и слюне, он легко попадает в аэрозоли (например, в результате чихания). Во избежание получения ложноположительных результатов из-за контаминации необходимо использовать перчатки в течение всей процедуры исследования, включая сбор образцов крови пациентов. Кроме того, все повышенные результаты рекомендуется перепроверять повторным анализом.
Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела, (HAMA) или гетерофильные антитела) присутствующие в образцах крови пациентов, могут иногда влиять на результаты исследования, несмотря на то, что в буфер включены специфические компоненты, блокирующие такое влияние.
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (13, 14). В исследовании Grimsey и др. (13) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (15).

Ожидаемые значения
С помощью набора CanAg SCC EIA были проанализированы 175 образцов крови здоровых доноров крови.
Верхний и нижний пределы диапазона нормальных значений были рассчитаны с использованием рекомендованной IFCC непараметрической статистической обработки. Референсный интервал соответствует 95% доверительному интервалу. Верхний предел был установлен таким образом, что соответствует 97.5% верхнему квантилю.

	Среднее µг/л	SD, µг/л	Медиана µг/л	Диапазон µг/л	Верхний доверительный предел, µг/л
здоровые доноры крови, n=175	0.58	0.24	0.54	0.16–1.5	1.2

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных значений с учетом локальных факторов окружающей среды, таких как питание, климат, условия жизни, отбор пациентов и т. д. Кроме того, необходимо учитывать, что индивидуальный базовый уровень каждого пациента является наиболее важным показателем для интерпретации результатов.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА
Точность
Общую точность рассчитывали согласно NCCLS руководству EP5-A (10), используя четыре уровня замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленный SCC-антиген человека в 18 различных комбинациях реагентов, входящих в состав набора CanAg SCC EIA. Каждый образец случайным образом (n=2/анализ) пипетировали и анализировали дважды в день ежедневно в течение 20 дней.

образец	Кол-во реплик	Среднее µг/л	SD внутри постановки µг/л	CV внутри постановки, %	SD между сутками µг/л	CV между сутками, %
1	80	2.62	0.05	1.9	0.04	1.3
2	80	7.77	0.16	2.0	0.15	1.9
3	80	17.7	0.34	1.9	0.20	1.1
4	80	30.2	0.71	2.4	0.38	1.3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предел обнаружения

Предел обнаружения набора CanAg SCC EIA составляет < 0.3 µг/л и определен как концентрация, соответствующая среднему значению оптической плотности калибратора A (CAL SCC A) плюс 2 стандартных отклонения, по формуле:

$$\frac{2 \times SD_{CAL\ A}}{OD_{CAL\ B} - OD_{CAL\ A}} \times [CAL\ B]\ \mu г/л$$

Извлечение

Обогащенные образцы сыворотки готовили путем добавления человеческого SCC-антигена в образцы нормальной сыворотки. Извлечение добавленного антигена составило 90–110 %.

Хук- эффект

Хук-эффект не наблюдался в образцах с концентрацией до 50 000 µг/л.

ЗАМЕЧАНИЕ: В образцах с очень высокой концентрацией цвет конечного раствора меняется с голубого на зеленоватый, а в итоге и на желтый, при очень высоких концентрациях, это может приводить к ложной низкой оптической плотности при измерении на длине волны 620 нм. В экстремальных случаях оптическая плотность может снижаться до диапазона калибровочной кривой и учитываться как хук-эффект.

Линейность

Образцы сыворотки пациентов были серийно разведены нормальной человеческой сывороткой и проанализированы. Полученные значения находились в диапазоне 90–110% от ожидаемых.

Специфичность

Метод CanAg SCC EIA основан на использовании двух различных мышиных моноклональных антител, захватывающих MAb SCC 140 и детектирующих MAb SCC 107 (11). Следуя руководству NCCLS EP7-P (12) были проанализированы возможные источники интерференции. Приведенные ниже в таблице вещества в указанных концентрациях были проанализированы и не выявлено какого-либо значительного влияния на результаты анализа.

	Концентрация, при которой не обнаружено значительной интерференции (± 10%)
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин, неконъюгированный	0.6 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 600 нг/мл. Средняя концентрация SCC была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. SCC с добавкой биотина / Средняя конц. SCC с добавкой только разбавителя).

Уровень SCC	**Конц. Биотина, нг/мл**	**Ожидаемая конц. SCC, µг/л**	**Наблюдаемая конц. SCC, µг/л**	**Извлечение, %**
Низкая	15	1.85	1.75	95
Высокая 1	15	17.4	16.8	97
Высокая 2	15	10.6	10.2	96
Низкая	30	1.85	1.76	95
Высокая 1	30	17.9	16.9	94
Высокая 2	30	10.5	9.91	95
Низкая	60	1.82	1.63	89
Высокая 1	60	18.0	15.7	87
Высокая 2	60	10.4	9.3	89
Низкая	200	1.83	0.40	22
Высокая 1	200	17.6	4.00	23
Высокая 2	200	10.6	3.03	29
Высокая 1	600	17.8	1.16	6
Высокая 2	600	11.1	0.88	8
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 41 нг/мл				

Сравнение методов

Метод CanAg SCC EIA сравнивали с методом Imx SCC MEIA.

В анализе 72 образцов человеческих сывороток в диапазоне 0–4 µг/л линейный регрессионный анализ дал следующие результаты:

CanAg SCC = 1.02 x Imx SCC + 0.03 r =0.86

В анализе 138 образцов человеческих сывороток в диапазоне 0–50 µг/л линейный регрессионный анализ дал следующие результаты:

CanAg SCC = 0.82 x Imx SCC + 0.06 r =0.98

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Suminami Y., Kishi F., Sekiguchi K., Kato H. (1991) quamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease nhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 51-58.
2. Kato H. and Torigoe T. (1977) Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 40, 1621-1628.
3. Schneider S.S., Schick C., Fish K.E., Miller E., Pena J.C., Treter S.D., Hui S.M., Silverman G.A. (1995) A serine protease inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 3147-3151.
4. de Bruijn H.W.A., Duk J.M., van der Zee A.G.J., Pras E., Willemse P.H.B., Boonstra H., Hollema H., Mourits M.J.E., de Vries E.G.E., Aalders J.G. (1998) The Clinical Value of Squamous cell Carcinoma Antigen in Cancer of the Uterine Cervix. *Tumor Biol* 19, 505-516.
5. Vassiliakopoulos T., Troupis T., Sotiropoulou C., Zacharatos P., Katsaounou P., Parthenis D., Noussia O., Troupis G., Papiris S., Kittas C., Roussos C., Zakynthinos S., Gorgoulis V. (2001) Diagnostic and prognostic significance of squamous cell arcinoma antigen in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 32, 137-144.
6. Snyderman C.H., Dámico F., Wagner R., Eibling D.E. (1995) A Reappraisal of the Squamous Cell Carcinoma Antigen as a Tumor Marker in Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121, 1294-1297.
7. Duk J.M., Groenier K.H., de Bruijn H.W.A., Hollema H., ten Hoor K.A., van der Zee A.G.J., Aalders J.G. (1996) Pretreatment Serum Squamous cell Carcinoma Antigen: A Newwly Identified Prognostic Factor in Early-Stage Cervical Carcinoma. *J Clin Oncol* 14, 111-118. 1997
8. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: p.19.
9. Yuyama N., et al., (2002) Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 19(6), 287-296.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. Röijer E., Nilsson K., Oskarsson M., Dahlén U., Andersson I., Nilsson O. (2003) Develoμr/лent of Monoclonal Antibodies and Immunoassays against different forms of Squamous Cell Carcinoma Antigens (SCCA). *Tumor Biol* 24, p. 83.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CanAg SCC EIA **Кат. N 800-10**

Готовьте реагенты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	**Флакон / Планшет**	**Действия**
1. Приготовьте калибраторы SCC	**CAL SCC** **A, B, C, D, E**	Внесите 0.75 мл дистиллированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре. **Замечание:** Точная концентрация каждого калибратора указана на этикетках флаконов. Данные значения калибраторов следует использовать для расчета результатов
2. Приготовьте буфер для промывок	**WASHBUF 25X**	Разведите 50 мл концентрата буфера для промывок в 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды
3. Приготовьте раствор антител	**CONJ Anti-SCC** **BIOTIN Anti-SCC**	Смешайте 50 мкл трейсера, HRP анти- SCC с 1 мл биотинилированных антител к SCC на стрип: **Кол-во стрипов / Трейсер мкл / Biotin anti-SCC 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
4. Промывка	**MICROPLA**	Промойте каждую лунку один раз буфером для промывок
5. Добавьте калибраторы и образцы	**CAL SCC** **A, B, C, D, E**	25 мкл в каждую лунку
6. Добавьте раствор антител	**ANTIBODY SOLUTION**	100 мкл в каждую лунку
7. Инкубация	**MICROPLA**	1 час, встряхивая, при комнатной температуре
8. Промывка	**MICROPLA**	Промойте каждую лунку 6 раз буфером для промывок
9. Добавьте субстрат	**SUBS TMB**	100 мкл в каждую лунку
10. Инкубация	**MICROPLA**	30 минут, встряхивая, при комнатной температуре
11. Считывание оптической плотности	**MICROPLA**	620 нм
Alt.11 Добавьте стоп-раствор	**STOP**	100 мкл в каждую лунку
Alt.12 Инкубация	**MICROPLA**	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
Alt.13 Считывание оптической плотности	**MICROPLA**	405 нм, считайте в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

CYFRA 21-1 EIA

Кат. N 211-10

IVD

Инструкция по применению. Версия 07.2019

CE

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения


Использовать до



Номер лота


Дата производства



Только для диагностики In Vitro



Номер по каталогу



Температурный режим



Содержит достаточные количества для «96» определений


Обратитесь к инструкции по применению

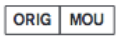


Компоненты набора

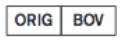

Биологическая опасность



Человеческого происхождения



Мышиного происхождения



Крупного рогатого скота


Растворить в


Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

CYFRA 21-1 EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор CYFRA 21-1 EIA предназначен для количественного определения растворимых фрагментов цитокератина 19 (CYFRA 21-1) в человеческой сыворотке. Анализ используется с целью мониторинга прогрессии заболевания и лечения пациентов с раком легкого. Серийный анализ CYFRA 21-1 должен использоваться в совокупности с другими клиническими методами в мониторинге рака легкого.

ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

Цитокератин 19 принадлежит семейству, состоящему из не менее, чем двадцати различных полипептидов цитокератинов. Цитокератины образуют промежуточные структуры филаментов эпителиальных клеток (1, 2). Филаменты цитокератинов плохо растворимы, но после протеолитической деградации образуются растворимые фрагменты цитокератинов, секретируемые в биологические жидкости.
Данный метод CYFRA 21-1 определяет уровень фрагментов цитокератина 19 в сыворотке (3-6). Данный метод CYFRA 21-1 EIA основан на использовании двух типов моноклональных антител (BM 19.21 и KS 19.1), специфических к цитокератину 19 (3, 7-8). Повышенные уровни фрагментов цитокератина 19 в сыворотке выявляются у больных с раком легких (5, 9-12) и с другими злокачественными опухолями (например, с раком мочевого пузыря) (13). Наиболее полезно использование теста определения CYFRA 21-1 в мониторинге и диагностике рецидивов рака легкого (11, 14-17).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор CYFRA 21-1 EIA является твердофазным, неконкурентным иммунологическим анализом, основанным на использовании двух мышиных моноклональных антител к различным антигенным детерминантам растворимых фрагментов цитокератина 19 (7-8). Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-CYFRA 21-1 моноклональными антителами и анти- CYFRA 21-1 моноклональными антителами, меченными пероксидазой хрена (HRP) (трейсер) в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. После промывки в каждую лунку добавляется забуференный

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

раствор субстрат/хромогена (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствии антигена развивается голубая окраска. Интенсивность окраски пропорциональна количеству CYFRA 21-1 в образце.
Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре с фильтром 620 нм (или, альтернативно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).
Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация CYFRA 21-1 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор CYFRA 21-1 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках, и хранятся и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2–8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение

MICROPLA

Микропланшет 1 планшет 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на планшете

12x8 разделяемых лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

CAL | CYFRA 21-1 | A

Калибратор A CYFRA 21-1 1 x 8 мл 2-8ºC до истечения срока годности

Содержит фосфатный буфер, бычий сывороточный альбумин, инертный желтый краситель, неазидный антимикробный консервант. Готов к использованию. Должен быть использован также и для разведения образцов.

Калибраторы CYFRA 21-1 B-F 5 флаконов, лиофилизированные Стабильны после растворения в течение 4 недель при 2-8°C или 4 месяцев при -20°C или ниже.

CAL	CYFRA 21-1	B	1x1 мл
CAL	CYFRA 21-1	C	1x1 мл
CAL	CYFRA 21-1	D	1x1 мл
CAL	CYFRA 21-1	E	1x1 мл
CAL	CYFRA 21-1	F	1x1 мл

Лиофилизированные калибраторы содержат антиген CYFRA 21-1 в фосфатном буфере, бычий сывороточный альбумин, инертный желтый краситель, неазидный антимикробный консервант. Должны быть растворены в дистиллированной воде перед использованием. **Замечание:** точные концентрации CYFRA 21-1 лот-специфичны и указаны на этикетках флаконов.

Контроли CYFRA 21-1 2 флакона, лиофилизированные Стабильны после растворения в течение 4 недель при 2-8°C или 4 месяцев при -20°C или ниже.

CONTROL	CYFRA 21-1	1	1x1 мл
CONTROL	CYFRA 21-1	2	1x1 мл

Лиофилизированные контроли, содержат антиген CYFRA 21-1 в человеческой сыворотке, неазидный антимикробный консервант. Должны быть растворены в дистиллированной или деионизированной воде перед использованием.

BIOTIN | Anti-CYFRA 21-1

Биотин/анти-CYFRA 21-1, 1x15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Биотинилированные мышиные анти-CYFRA 21-1 моноклональные антитела, ≈ 1.25 мкг/мл. Раствор содержит солевой раствор Tris-HCl буфера (pH 7.2), бычий сывороточный альбумин, блокирующие агенты, детергент, инертный синий краситель, неазидный антимикробный консервант. Должен быть смешан с трейсером перед использованием.

CONJ | Anti-CYFRA 21-1

Трейсер, HRP/анти- CYFRA 21-1 1x0.75 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Сток-раствор HRP с анти-CYFRA 21-1 моноклональными антителами мыши, ≈ 42 мкг/мл. Содержит неазидный антимикробный консервант. Должен быть перед использованием смешан с Биотин/анти- CYFRA 21-1 .

SUBS | TMB

HRP-Субстрат ТМБ 1x 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ).

STOP

Стоп-раствор 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе
Готов к использованию. Содержит 0.12 М соляную кислоту.

WASHBUF | 25X

Концентрат буфера для промывок 1x50 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Содержит Tris-HCl буферный солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой.

Признаки нестабильности
Раствор **HRP**-субстрата ТМВ должен быть бесцветный или слегка голубоватый. Голубой цвет свидетельствует о загрязнении реагента и раствор должен быть выброшен.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики In Vitro:

• Следуйте указаниям, приведенным в настоящей инструкции. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если анализ выполнен с какими-либо отклонениями от инструкции, прилагаемой к набору.

• Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными. С реагентами, содержащими компоненты человеческого происхождения, и с образцами человеческого происхождения рекомендуется обращаться согласно Стандарту OSHA по работе с патогенами (19). При работе с материалами, содержащими или потенциально содержащими инфекционные агенты необходимо соблюдать уровень безопасности 2 (20) или другой соответствующий уровень безопасности.

• Избегайте контакта с реагентами, содержащими пероксидазу хрена и соляную кислоту. При попадании реагентов на кожу или в глаза тщательно промойте водой.

• Следуйте принятым инструкциям при утилизации всех отработанных материалов.

Внимание:
Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Но, так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие инфекционных заболеваний, передающихся с кровью, то со всеми материалами человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Данный набор CYFRA 21-1 EIA разработан для использования сыворотки. Соберите кровь из вены методом венепункции согласно принятой процедуре. Образцы можно хранить при 2—8°C в течение 1 дня до анализа. Для более длительного хранения образцы необходимо хранить при температуре -40°C или ниже. Избегайте циклов повторного замораживания/оттаивания образцов. При аликвотировании образцов выбирайте правильный объем пробирок для хранения, т.е. пустое пространство в пробирке должно быть минимально. Перед анализом все образцы должны достичь комнатной температуры. Тщательно перемешайте образцы перед анализом, несколько раз аккуратно переворачивая пробирки. *Можно использовать для перемешивания образцов электрический вибрационный миксер (Вортекс) не дольше 1 секунды.*

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 900-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если нет автоматического промывающего устройства, рекомендовано использовать ручной 8-канальный вошер Nunc.
3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна. Пипетки для внесения объемов в миллилитрах.
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Для растворения калибраторов и контролей CYFRA 21-1, и для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать инструкцию к настоящему набору CYFRA 21-1 EIA и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов.
   Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры (20-25ºC). Инкубация при температуре ниже рекомендуемой может привести к ложно завышенным результатам. Инкубация при температуре выше рекомендуемой может привести к ложно заниженным результатам.
3. Реагенты перед использованием должны быть доведены до комнатной температуры (20–25°C). Замороженные образцы должны быть аккуратно, но тщательно перемешаны путем плавного переворачивания после оттаивания. *Перемешивание образцов с использованием электрических вибрационных миксеров (Vortex) должно быть ограничено максимум 1 секундой*. Если аликвотируете образцы перед замораживанием, выберите пробирки подходящего объёма, чтобы ограничить пустое пространство в пробирке.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Перед внесением калибраторов и образцов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
5. Требование эффективной и тщательной промывки для отделения связанного и несвязанного антигена и реагентов от комплексов твердофазное антитело-антиген является одним из наиболее важных при проведении этапов ИФА. Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что все лунки полностью заполнены до верхнего края промывочным раствором во время каждого цикла промывки, этот промывочный раствор вносится с хорошим потоком, а также аспирация лунок между и после циклов промывки завершена и лунки пусты. Если в лунках осталась жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматический вошер: следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и промывайте с необходимым количеством циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Настоятельно рекомендовано использовать режим работы со стрипами и режим промывки с переливом при объеме дозирования 800 мкл. Устройство для аспирации/промывки не следует оставлять на некоторое время заполненным промывочным раствором, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому дозированию и аспирации жидкости.
6. Раствор HRP-субстрата ТМВ очень чувствителен к контаминации. Для сохранения стабильности реагента перенесите необходимое количество реагента из флакона в чистый резервуар или одноразовую пластиковую ванночку, для того чтобы избежать контаминации реагента. Во время работы с субстратом ТМБ убедитесь в том, что вы используете чистые одноразовые пластиковые наконечники.
7. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику точного дозирования при работе с образцами и реагентами. Не допускайте контакта наконечника пипетки с поверхностью жидкости, чтобы избежать ее переноса. Правильная техника дозирования имеет особое значение при внесении образцов и раствора ТМВ субстрата.

Приготовление реагентов	**Стабильность приготовленного реагента**

Калибраторы CYFRA 21-1

4 недели при 2-8°C
4 месяца при -20°C или ниже

Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.

Замечание: точные концентрации калибраторов указаны на этикетке каждого флакона и должны быть использованы для расчета результатов. Перемешивайте только осторожным покачиванием или переворачиванием. *Перемешивание калибраторов с использованием электрических вибрационных миксеров (Vortex) должно быть не дольше 1 секунды.*

Контроли CYFRA 21-1

1 неделя при 2-8°C
4 месяца при -20°C или ниже

Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.

Замечание: допустимый диапазон концентрации контролей указан на этикетке каждого флакона. Перемешивайте только осторожным покачиванием или переворачиванием. *Перемешивание калибраторов с использованием электрических вибрационных миксеров (Vortex) должно быть не дольше 1 секунды.*

Буфер для промывок 2 недели при +2-+25ºC в герметичном контейнере

Перенесите 50 мл концентрата буфера для промывок в чистый контейнер и разведите в 25 раз, добавив 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения готового буфера для промывок.

Раствор антител 1 день при +2-+8ºC

Приготовьте нужный объем раствора антител смешиванием 50 мкл раствора трейсера, HRP-анти CYFRA 21-1 с 1 мл Биотинилированных Анти - CYFRA 21-1 на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Трейсер, HRP-анти CYFRA 21-1 (мкл)	Биотин. Анти-CYFRA 21-1 (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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные резервуары для приготовления рабочего раствора антител.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Проводите каждое измерение калибраторов, контролей и образцов пациентов в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Все реагенты и образцы перед проведением анализа должны достичь комнатной температуры (20-25ºC).

1. Начните с приготовления калибраторов CYFRA 21-1, контролей 1 и 2, буфера для промывок и раствора антител. Очень важно использовать только чистые контейнеры. Тщательно соблюдайте данную инструкцию.
2. Установите требуемое количество стрипов в рамке-держателе. (Сразу верните неиспользуемые стрипы в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

алюминиевый пакет и тщательно закройте его.) Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.

3. Перемешайте образцы осторожным переворачиванием. *Не перемешивайте с помощью вортекса в течение более 1 секунды*. Внесите пипеткой по 50 мкл калибраторов CYFRA 21-1 (кал. A, B, C, D, E и F), контролей 1 и 2 и анализируемых образцов (обр.) в лунки стрипов согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. A	кал. E	обр. 1		
B	кал. A	кал. E	обр. 1		
C	кал. B	кал. F	обр. 2		
D	кал. B	кал. F	обр. 2		
E	кал. C	К. 1	и т. д.		
F	кал. C	К. 1			
G	кал. D	К. 2			
H	кал. D	К. 2			

4. Внесите 100 мкл раствора антител в каждую лунку, используя одно - или восьмиканальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкостей между лунками, держите наконечник пипетки чуть выше края лунки и избегайте касания стрипов или поверхности жидкости.

5. Инкубируйте микропланшет 1 час (± 5 минут) при комнатной температуре (20-28ºC) с постоянным перемешиванием на шейкере.

6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз.

7. Внесите в каждую лунку по 100 мкл субстрата ТМБ, в той же последовательности, как в п.4. Раствор HRP-субстрата ТМБ следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.

8. Инкубируйте микропланшет 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.

9. Немедленно считайте оптическую плотность на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет микропланшетного спектрофотометрического ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в этапе 9альт ниже.

9альт. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

Данным методом CYFRA 21-1 EIA могут быть измерены концентрации в диапазоне от 0,5 до приблизительно 50 нг/мл. Если концентрация CYFRA 21-1 в образце превышает измеряемый диапазон, перед анализом образец необходимо развести калибратором A CYFRA 21-1 (см. раздел “Расчет результатов для разведенных образцов ”).

Контроль качества

Для контроля качества измерений должны быть использованы контроли CYFRA 21-1 1 и 2, поставляемые в наборе. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.

Результаты измерения CYFRA 21-1 данным методом считаются достоверными, если:

- Средние значения дублей, полученные для контролей, попадают в диапазон допустимых значений.
- Коэффициент вариации (CV) дублей калибраторов B-F и контролей не превышает 15%.
- Разница значений оптической плотности дублей калибратора A (ноль) составляет не более 0.06 оптических единиц.

Если в ходе исследования получены недостоверные результаты для калибраторов или контролей, необходимо полностью проверить все реагенты и оборудование, точность пипеток, правильность работы ридера и вошера и повторить анализ. Каждой лаборатории рекомендуется приготовить свои собственные пулы сывороток с различными уровнями, которые можно использовать для внутреннего контроля качества исследований.

Референсные материалы

Так как не существует международного референсного стандарта для антигена CYFRA 21-1, значения калибраторов данного набора CYFRA 21-1 EIA были установлены по набору внутренних стандартов производителя.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора CYFRA 21-1. Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать метод аппроксимации кубическим сплайном. Калибратор A должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 нг/мл.

Результаты анализа CYFRA 21-1, показанные в этой инструкции, были рассчитаны при построении кривой методом кубического сплайна в программном обеспечении Molecular Devices SOFTmax® PRO. Этот метод позволяет построить кривую по кубическому уравнению между каждой парой точек данных. Общая форма кубического уравнения: $y = A + Bx + Cx^2 + Dx^3$.

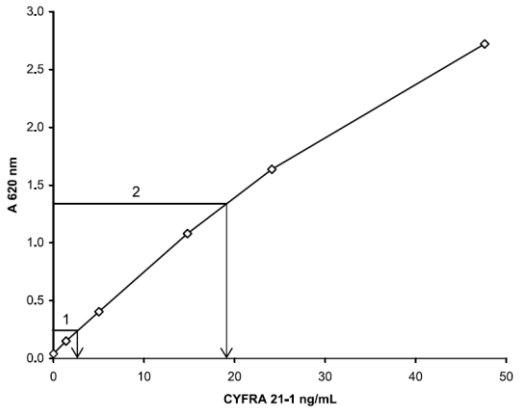
Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (A), полученных для каждого калибратора против соответствующих концентраций CYFRA 21-1 (в нг/мл). Неизвестные значения концентраций CYFRA 21-1 в образцах находят по калибровочной кривой, используя оптическую плотность образца.

Пример результатов

Образец	**Концентрация в калибраторе (нг/мл)**	**Средняя ОП (A)**	**CYFRA 21-1 нг/мл**
Калибратор A	0	0.041	
Калибратор B	1.4	0.151	
Калибратор C	5.0	0.405	
Калибратор D	14.8	1.080	
Калибратор E	24.1	1.635	
Калибратор F	47.6	2.721	
Образец 1		0.259	2.9

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец 2		1.366	19.4



Пример, не используйте данную кривую для определения результатов реального анализа.
Точная концентрация CYFRA 21-1 указана на этикетке каждого флакона калибратора.

Примечание: Метод расчета концентрации CYFRA 21-1 по формуле должен использоваться постоянно для мониторинга пациентов.

Расчет результатов для разведенных образцов
Если образец дает значение CYFRA 21-1 больше диапазона измерения, необходимо разбавить калибратором A CYFRA 21-1. Рекомендовано разведение 1/2.
Разбавление 1/2 = 100 мкл образца + 100 мкл калибратора A CYFRA 21-1
Концентрация CYFRA 21-1 в исходных образцах рассчитывается следующим образом:
Разбавление в 1/2: 2 x Полученное значение

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

У пациентов с подтвержденным раком легкого значения CYFRA 21-1 могут лежать в одном диапазоне со значениями, определяемыми для здоровых лиц. Повышенные уровни CYFRA 21-1 также могут быть обнаружены у пациентов с незлокачественными заболеваниями, например, почечной недостаточностью и некоторыми доброкачественными заболеваниями дыхательной системы (13, 18). Таким образом, уровень CYFRA 21-1 нельзя использовать в качестве абсолютного доказательства наличия или отсутствия злокачественного заболевания, а CYFRA 21-1 EIA не следует использовать при скрининге рака. Результаты теста должны интерпретироваться в диагностике только в сочетании с результатами других исследований и диагностических процедур. Анализ CYFRA 21-1 не должен заменять какого-либо утвержденного клинического обследования. Эффективность анализа не была адекватно подтверждена при мелкоклеточном раке легкого (SCLC), крупноклеточном раке и раке легкого I и II стадии.
Иногда присутствующие в образце пациента антитела к реагентам набора (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела) могут интерферировать с данным анализом, даже если в буфер включены специфические блокирующие агенты. *Чрезмерное перемешивание может привести к ложно заниженным уровням CYFRA 21-1, поэтому перемешивание образцов с использованием электрических вибрационных миксеров (Vortex) должно быть ограничено максимум 1 секундой. Если образцы аликвотируются, ограничьте пустое пространство в пробирке, чтобы избежать напряжения во время перемешивания.*
Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (25, 26). В исследовании Grimsey и др. (25) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (27).

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Были оценены уровни CYFRA 21-1 в 875 образцах, результаты приведены ниже:
Распределение уровней CYFRA 21-1

	№ лиц	0 – 1.8 нг/мл	1.9 – 5.0 нг/мл	5.1 – 20.0 нг/мл	> 20.0 нг/мл
Практически здоровые Норма все	240	228	12	0	0
Доброкачественные состояния Доброкачественные заболевания легких	75	71	4	0	0
ХСН	40	30	10	0	0
Доброкачественные заболевания печени	40	38	2	0	0
Доброкачественные заболевания почек	40	4	32	4	0
Рак Рак легких	120	47	36	24	13
Рак мочевого пузыря	40	17	3	12	8
Рак груди	40	32	6	1	1
Рак шейки матки	40	24	13	3	0
Рак плоскоклеточный пищевода	40	13	18	7	2
Рак ЖКТ	40	25	10	4	1
Рак шеи и головы	40	30	9	1	0
Рак простаты	40	37	1	2	0
Рак яичника	40	23	10	5	2

В данном исследовании у 95% здоровых лиц уровни CYFRA 21-1 были на уровне 1,8 нг/мл или ниже. Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон для обследуемой популяции.

Мониторинг течения заболевания у пациентов с диагностированным раком легких
Эффективность метода CYFRA 21-1 EIA для контроля заболевания у пациентов с раком легкого была определена в ретроспективном клиническом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

исследовании. Изменения уровней CYFRA 21-1 в серийных образцах сыворотки, взятых из терциарных онкологических центров, сравнивали с изменениями в статусе заболевания. Было проведено исследование с участием 100 пациентов с 314 парными наблюдениями, средним числом наблюдений на пациента 4,1. Из 100 случаев рака легких 95 были классифицированы как немелкоклеточный рак легких (NCSLC) и 5 были классифицированы как мелкоклеточный рак легких (SCLC). 90 из NSCLC были далее классифицированы как аденокарцинома (68), плоскоклеточный рак (19) и крупноклеточный рак (3). Как показано в следующей таблице, в 79 из 100 случаев рака легких имелась информация о стадии заболевания. В этом исследовании только у 5 пациентов была I или II стадии болезни, эффективность CYFRA 21-1 не была адекватно оценена в данной группе пациентов.

	Количество пациентов
Стадия I	2
Стадия II	3
Стадия III	36
Стадия IV	38
Всего (с информацией о стадии)	**79**
Неизвестно	17
Без стадии	4
Общее количество случаев рака легких	**100**

Прогрессивное изменение CYFRA 21-1 было определено как значимое повышение уровня, при котором последующее значение было как минимум на 50% больше предыдущего. Если при парном наблюдении оба значения ниже нормального референсного диапазона 1,8 нг/мл, то эти изменения оцениваются как несущественные. Данный уровень изменений связан с вариабельностью анализа и биологической изменчивостью (14).

У сорока шести процентов пациентов (46%) или в 39/85 образцов с прогрессивным изменением было связано прогрессирование заболевания, в то время как у 87% пациентов (200/229 серийных образцов) без значительных изменений уровня CYFRA 21-1 прогрессирования заболевания не отмечалось. Общая сходимость составила семьдесят шесть процентов (76%) или 239/314. В следующей таблице представлены данные в формате 2 x 2.

Изменения в статусе заболевания в последовательных парах

Увеличение концентрации CYFRA 21-1	**Прогресси-рование**	**Отсутствие прогрессии**	**Всего**
>50%	39	29	68
<50%	46	200	246
Всего	**85**	**229**	**314**

Клиницисты могут использовать другие процентные изменения концентрации CYFRA 21-1, которые будут отражать их предпочтения оптимального баланса между чувствительностью и специфичностью.

В следующей таблице приведены полученные значения чувствительности и специфичности метода CYFRA 21-1 EIA при различных процентных изменениях концентраций CYFRA 21-1, а также положительные прогностические значения (PPV) и отрицательные прогностические значения (NPV) в исследуемой популяции (85 последовательных пар пациентов с прогрессирующим заболеванием и 229 последовательных пар пациентов без прогрессии).

• Чувствительность представлена как доля пациентов с прогрессией заболевания, у которых отмечено повышение уровня CYFRA 21-1

• Специфичность представлена как доля пациентов без прогрессии заболевания, у которых не отмечалось повышение уровня CYFRA 21-1

• PPV представлена как доля пациентов с повышенным уровнем CYFRA 21-1, у которых отмечено прогрессирование заболевания

• NPV представлено как доля пациентов без повышения уровня CYFRA 21-1, у которых не отмечено прогрессирования заболевания.

% повышения концентрации CYFRA 21-1	**Чувствительность (%)**	**Специфичность (%)**	**PPV (%)**	**NPV (%)**
30	52.9	84.3	55.6	82.8
40	48.2	85.6	55.4	81.7
50	45.9	87.3	57.4	81.3
60	44.7	88.2	58.5	81.1
70	43.5	89.5	60.7	81.0

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Точность

Оценка точности метода CYFRA 21-1 EIA была проведена в соответствии с руководством EP5-A2 Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) (21). Панель из четырех образцов сыворотки была протестирована с использованием двух лотов реагентов в дублях, два раза в день в течение 20 дней в двух разных лабораториях. Совместные данные из двух лабораторий приведены ниже. *

Образец	**Лот реагента**	**Количество**	**Средняя концентрация, нг/мл**	**SD внутри серии (нг/мл)**	**CV% внутри серии анализов**	**SD общая (нг/мл)**	**CV% общая**
1	1	160	2.69	0.10	3.7	0.16	6.1
	2	160	2.91	0.15	5.1	0.25	8.4
2	1	160	7.28	0.31	4.3	0.50	6.9
	2	160	7.63	0.31	4.1	0.56	7.3
3	1	160	17.4	0.42	2.4	0.92	5.3
	2	160	18.6	0.48	2.6	0.91	4.9
4	1	160	33.4	0.88	2.6	1.62	4.9
	2	160	35.7	1.37	3.8	1.99	5.6

**Репрезентативные данные, результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от представленных.*

Общая точность для CYFRA 21-1 EIA определена как <8,6% CV.

Предел обнаружение и предел количественного определения

Предел определения набора CYFRA 21-1 EIA был рассчитан как 0,12 нг/мл. Для определения метода оценки ПО было использовано руководство NCCLS, EP17-A (22). Предел обнаружения соответствует верхнему пределу 95% доверительного интервала и представляет собой наименьшую концентрацию антигена CYFRA 21-1, которая отлична от нуля.

Предел количественного определения набора CYFRA 21-1 EIA был рассчитан как 0,21 нг/мл. Предел

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

количественного определения представляет собой наименьшее количество аналита в образце, которое можно точно рассчитать с максимально допустимой погрешностью 17.78%.

Извлечение

Среднее извлечение набора CYFRA 21-1 EIA составляет 100 ± 20%. В проведенных исследованиях образцы разведений антигена с известными концентрациями CYFRA 21-1 EIA были добавлены к нормальным образцам человеческой сыворотки. Концентрации CYFRA 21-1 определяли с использованием данного метода CYFRA 21-1 EIA, а затем рассчитывали процент извлечения. Представительные данные этого исследования приведены в таблице ниже*.

Образец	Эндогенное значение, нг/мл	Добавленный CYFRA 21-1 антиген, нг/мл	Наблюдаемое значение CYFRA 21-1, нг/мл	Извле-чение**, %
1	0.5	2	2.3	93
		5	5.4	100
		16	15.4	91
		38	39.9	103
2	0.5	2	2.5	99
		5	5.2	96
		16	16.4	97
		38	39.6	102
3	0.5	2	2.6	102
		5	5.4	99
		16	16.1	95
		38	42.0	108
4	0.5	2	2.4	95
		5	5.3	98
		16	17.6	104
		38	43.1	111
5	0.5	2	2.4	96
		5	5.4	100
		16	17.1	101
		38	39.2	101

**Репрезентативные данные, результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от представленных.*
*** % извлечения = наблюдаемая концентрация CYFRA 21-1 (нг/мл) / эндогенная концентрация CYFRA 21-1 (нг/мл) + добавленный CYFRA 21-1 (нг/мл)*

Среднее извлечение, по четырем различным обогащенным концентрациям, приведенным выше, составило 100%.

Хук-эффект

Эффект высоких концентраций (Хук-эффект) – это феномен, когда очень высокая концентрация аналита в образце может читаться в пределах диапазона измеряемых значений метода. Для метода CYFRA 21-1 EIA, Хук-эффект не был обнаружен до концентрации 1100 нг/мл антигена CYFRA 21-1.

Линейность разведения

Исследование было проведено согласно руководству NCCLS (CLSI), EP6-A (23). Образцы сывороток с повышенными уровнями CYFRA 21-1 были разведены калибратором A (ноль) CYFRA 21-1. Концентрация CYFRA 21-1 была определена для каждого разведения и был рассчитан процент (%) извлечения. Репрезентативные данные этого исследования приведены в таблице ниже*.

Образец	Фактор конечного разведения	Полученное значение (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	извлечение** (%)
A	Без разведения	42.400	42.400	100.0
	1:1.25	35.969	33.920	106.0
	1:2.5	17.540	16.960	103.4
	1:5	8.513	8.480	100.4
	1:10	4.078	4.240	96.2
	1:20	2.165	2.120	102.1
	1:40	1.010	1.060	95.3
	1:100	0.416	0.424	98.1
B	Без разведения	44.446	44.446	100.0
	1:1.25	36.524	35.557	102.7
	1:2.5	17.967	17.778	101.1
	1:5	8.292	8.889	93.3
	1:10	3.855	4.445	86.7
	1:20	2.090	2.222	94.0
	1:40	1.013	1.111	91.2
	1:100	0.494	0.444	111.1
C	Без разведения	43.511	43.511	100.0
	1:1.25	36.738	34.809	105.5
	1:2.5	18.202	17.404	104.6
	1:5	8.606	8.702	98.9
	1:10	4.094	4.351	94.1
	1:20	2.164	2.176	99.5
	1:40	1.005	1.088	92.4
	1:100	0.399	0.435	91.7

**Репрезентативные данные, результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от представленных.*
*** % извлечения = полученная концентрация CYFRA 21-1 x 100 / ожидаемая концентрация.*

Отсутствие линейности, рассчитанное по взвешенной полиномиальной регрессии, составило ≤ 10% по всему диапазону измерений от 0.5 до 50.0 нг/мл.

Аналитическая специфичность

В среднем аналитическая специфичность метода CYFRA 21-1 EIA составила 100 ± 15%. Были проведены сравнительные исследования извлечения образцов, содержащих соединения, перечисленные ниже, в указанных концентрациях, и контролей сывороток. Для определения метода оценки интерференции было использовано руководство NCCLS, EP7-A (24). Все вещества в проверенных концентрациях не оказывали влияния на результат анализа.

Эндогенные потенциально влияющие вещества сыворотки	Проверенные концентрации
Триглицериды	30 мг/мл
Билирубин	0.2 мг/мл
Гемоглобин	5 мг/мл
Общий белок	120 мг/мл

Химиотерапевтические потенциально влияющие лекарственные препараты	Проверенные концентрации
карбоплатин	500 мкг/мл
цисплатин	165 мкг/мл
Дексаметазон	10 мкг/мл
Доксорубицин	1.16 мкг/мл
лейковорин	2.68 мкг/мл
мелфалан	2.8 мкг/мл
метотрексат	45 мкг/мл
паклитаксел	3.5 нг/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 600 нг/мл. Средняя концентрация CYFRA 21-1 была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. CYFRA 21-1 с добавкой биотина / Средняя конц. CYFRA 21-1 с добавкой только разбавителя).

Уровень CYFRA 21-1	Конц. Биотина (нг/мл)	Ожидаемая конц. CYFRA 21-1, нг/мл	Наблюдаемая конц. CYFRA 21-1, нг/мл	Извлечение, %
Низкая	15	1.96	1.89	97
Низкая	30	2.07	1.67	80
Низкая	60	2.14	0.84	39
Высокая	60	22.9	9.67	42
Низкая	600	2.13	0.13	6
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 9 нг/мл.				

Потенциально влияющие клинические состояния

Для дополнительной оценки специфичности, методом CYFRA 21-1 EIA были проанализированы образцы, содержащие HAMA и ревматоидный фактор (RF). В 6 образцах, содержащих HAMA и в 5 образцах, содержащих РФ, был оценен % извлечения антигена CYFRA 21-1, добавленного в каждый образец в концентрациях приблизительно 5 и 25 нг/мл. Средние результаты анализа извлечения суммированы в таблице, приведенной ниже.*

клинические состояния	Количество образцов	Среднее извлечение, %
HAMA	6	98
RF	5	101

**Репрезентативные данные, результаты в отдельных лабораториях могут отличаться от представленных.*

Гарантии

Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors, and cultured cells. Cell 1982;31:11-24
2. Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: Novel Keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. J Cell Sci 2001;114:2569-2575
3. Bodenmüller H, Ofenloch-Hähnle B, Lane EB, Dessauer A, Böttger V, Donié F. Lung Cancer associated Keratin 19 fragments: Development and Biochemical Characterization of the new Serum Assay Enzymun-Test CYFRA 21-1. Int J Biol Markers 1994;9:75-81
4. Bodenmüller H. The Biochemistry of CYFRA 21-1 and other cytokeratin-tests. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1995;221:60-66
5. Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, Müller C, Poley S, Hofmann K, Fateh-Moghadam. Comparison of Cytokeratin Fragment 19 (CYFRA 21-1) Tissue Polypeptide antigen (TPA) and Tissue Polypeptide Specific Antigen (TPS) as Tumor Markers in Lung Cancer. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993;31:689-694
6. Bodenmüller H, Donié F, Kaufmann M, Banauch D, The tumor markers TPA, TPS, TPAcyk and CYFRA 21-1 react differently with the keratins 8, 18 and 19. Int J Biol Markers 1994;9:70-74.
7. Böttger V, Stasiak PC, Harrison DL, Mellerick DM, Lane EB. Epitope mapping of monoclonal antibodies to keratin 19 using keratin fragments, synthetic peptides, and phage peptide libraries. Eur J Biochem 1995;231(2):475-85.
8. Stigbrand T et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. Tumor Biol 1998;19(2): 132-52.
9. Stieber P, Hasholzner U, Bodenmüller H, Nagel D, Sunder-Plassmann L, Dienemann H, Meier W, Fateh-Moghadam A. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer. Cancer 1993;72(3):707-13.
10. Ebert W, Dienemann H, Fateh-Moghadam A, Scheulen M, Konietzko N, Schleich T, Bombardieri E. Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuron- specific enolase in lung cancer. Results of an international multicentre study. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994;32(3):189-99.
11. Stieber P, Zimmermann A, Reinmiedl J, Müller C, Hoffmann H, Dienemann H. CYFRA 21-1 in the early diagnosis of recurrent disease in non small cell lung carcinomas (NSCLC). Anticancer Res 1999;19(4A): 2665-8.
12. Pujol JL, Molinier O, Ebert W, Daurès JP, Barlesi F, Buccheri G, Paesmans M, Quoix E, Moro-Sibilot D, Szturmowicz M, Bréchot JM, Muley T, Grenier J. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. Br J Cancer 2004;90(11):2097-105.
13. Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, Fabricius PG, Schambeck C, Weinzierl M, Poley S, Samtleben W, Hofmann K, Meier W, et al. Comparison of CYFRA 21-1, TPA and TPS in lung cancer, urinary bladder cancer and benign diseases. Int J Biol Markers 1994;9(2):82-8.
14. Trapé J, Perez de Olaguer J, Buxó J, López L. Biological Variation of Tumor Markers, and Its Application in the Detection of Disease Progression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Chem 2005;51:219-222
15. Volmer RT, Govindan R, Graziano SL, Gamble G, Garst J, Kelley MJ, Christenson RH. Serum CYFRA 21-1 in Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer: An early measure of Response. Clin Cancer Res 2003; 9:1728-1733.
16. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Siedel D. Early and Specific Prediction of the Therapeutic Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Nucleosomal DNA and Cytokeratin-19 Fragments. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006; 1075:244-257.
17. Holdenrieder S, von Pawel J, Dankelmann E, Duell T, Faderl B, Markus A, Siakavara M, Wagner H, Feldmann K, Hoffmann H, Raith H, Nagel D, Stieber P. Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring First- Line Chemotherapy of Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res:2008; 14(23): 7813-7821.
18. Nakayama M, Satoh H, Ishikawa H, Fujiwara M, Kamma H, Ohtsuka M, Sekizawa K. Cytokeratin 19 Fragment in Patients With Nonmalignant Respiratory Diseases. Chest: 2003; 123: 2001-2006.
19. US Department of Labor, Occuptional Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
20. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Protocols for Determina- tion of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

25. . Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. J Pharmacokinet. 2017; 2(4); 247-256.
26. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. JALM 2018; 2(6); 941-951.
27. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. Clinical Chemistry 2017; 63; 619-620.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

CYFRA 21-1 EIA Кат. N 211-10

Готовьте компоненты непосредственно перед использованием. Соблюдайте условия промывок и инкубаций в соответствии с данной инструкцией.

Шаг	**Флакон/Микропланшет**	**Действия**
1. Приготовьте калибраторы CYFRA 21-1	CAL | CYFRA 21-1 B, C, D, E, F	Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре для полного растворения и тщательно перемешайте перед использованием. Замечание: точные концентрации каждого калибратора CYFRA 21-1 указаны на этикетке каждого флакона.
Приготовьте контроли CYFRA 21-1	CONTROL | CYFRA 21-1 1, 2	Смешивание калибраторов с использованием электрических вибрационных миксеров (Vortex) должно быть ограничено максимум 1 секундой.
Приготовьте буфер для промывок	WASHBUF | 25X	Разведите 50 мл концентрата буфера для промывок в 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды
Приготовьте рабочий раствор антител	CONJ | Anti- CYFRA 21-1 BIOTIN | Anti- CYFRA 21-1	Смешайте 50 мкл трейсера, HRP-анти CYFRA 21-1 с 1 мл BIOTIN Anti- CYFRA 21-1 на стрип,:

№ стрипа	**Трейсер HRP Anti- CYFRA 21-1 мкл**	**BIOTIN Anti- CYFRA 21-1 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

2. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку один раз буфером для промывок, используя ручной или автоматический вошер.
3. Добавьте калибраторы, контроли и образцы	CAL | HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL | HE4 1, 2, образцы	50 мкл в каждую лунку. Смешивание образцов с использованием электрических вибрационных миксеров (Vortex) должно быть ограничено максимум 1 секундой.
4. Добавьте раствор антител	ANTIBODY | SOLUTION	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре (20-25ºC)
6. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку 6 раз буфером для промывок, используя ручной или автоматический вошер
7. Добавление субстрата	SUBS | TMB	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая при комнатной температуре (20-25ºC)
9. Считывание оптической плотности	MICROPLA	620 нм
9a. Добавьте стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую лунку
10a. Перемешивание	MICROPLA	Оставьте для перемешивания при комнатной температуре (20-25ºC)
11a. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считайте при 405 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

HE4 EIA

Кат. N 404-10

IVD

Инструкция по применению. Версия -07.2019 CE

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

	Использовать до
LOT	Номер лота
	Дата производства
IVD	Только для диагностики In Vitro
REF	Номер по каталогу
2°C 8°C	Температурный режим
Σ	Содержит достаточные количества для «96» определений
	Обратитесь к инструкции по применению
CONT	Компоненты набора
	Биологическая опасность
ORIG HUM	Человеческого происхождения
ORIG MOU	Мышиного происхождения
ORIG BOV	Крупного рогатого скота
	Растворить в
	Производитель

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции.

Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

HE4 EIA

Инструкция по применению
Набор для иммуноферментного анализа
Для 96 определений

Назначение

Настоящий набор HE4 EIA предназначен для количественного определения опухолевого маркера HE4 в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа.
Данный набор может быть использован для мониторинга ответа на проводимую терапию у пациенток с инвазивными эпителиальными опухолями яичника. Серийные определения HE4 у пациенток должны использоваться в сочетании с другими клиническими методами, используемыми для мониторинга рака яичников.
Кроме того, данный метод предназначен для совместного использования с методом определения ARCHITECT CA 125 II, CanAg CA125 EIA или Lumipulse G CA125II, с целью оценки риска наличия эпителиального рака яичника у женщин в пре- или постменопаузальный период, с выявленными образованиями в малом тазу. Результаты анализа должны интерпретироваться с учетом других обследований в соответствии со стандартными руководствами по обследованию пациенток.

Введение и объяснение метода

Белок 4 эпидидимиса человека (HE4) принадлежит семейству сывороточных кислых белков, содержащих 4 дисульфидных связи в ядерной части (WFDC), с предполагаемыми свойствами ингибитора трипсина. К этому семейству относятся такие белки, как SLPI (секреторный лейкоцитарный ингибитор протеазы), элафин и PS20 (WFDC1) (1, 2). Ген HE4 кодирует белок массой 13 кДа. Молекулярная масса зрелого гликозилированного белка составляет приблизительно 20-25 кДа, он состоит из одного пептида, содержащего два WFDC домена (3). HE4 впервые был идентифицирован в эпителии дистального эпидидимиса, и первоначально были предсказаны его свойства как ингибитора протеаз, участвующего в созревании спермы (4, 5). Была показана экспрессия HE4 во многих нормальных тканях, включая эпителий респираторного тракта и репродуктивной системы, а также в тканях опухолей яичника (6-10). В дополнении к экспрессии на клеточном уровне отмечался высокий уровень секреции HE4 в кровоток у пациенток с раком яичников. В исследовании случай/контроль

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сравнения пациенток с раком яичника с пациентками с доброкачественными новообразованиями и здоровыми женщинами Hellström и соавт. показали, что чувствительность HE4 для выявления рака яичников составляет 67% при специфичности 96% (11). При дальнейшем изучении многочисленных известных биомаркеров рака яичников HE4 продемонстрировал наибольшую чувствительность для рака яичников, особенно на ранней стадии заболевания. Исследование показало, что сочетанное определение HE4 и CA125 является наиболее точным предиктором наличия злокачественного новообразования, чем любой из маркеров в отдельности, с чувствительностью 76% при специфичности 95% (12).

Рак яичников стоит на четвертом месте среди наиболее частых причин смерти женщин от злокачественных новообразований. В Европе смертность составляет 3.6 - 9.3 на 100000 женщин (13). Симптомы рака яичников связаны с образованиями в придатках яичников, неопределенны и неспецифичны. Главная задача диагностических процедур при выявлении образования в малом тазу – это определение злокачественной или доброкачественной природы заболевания. Показано, что в США приблизительно 5 – 10 % женщин подвергаются хирургическому вмешательству по поводу предполагаемой злокачественной опухоли яичника в течение жизни, но только у 13 – 21 % этих женщин действительно выявляется рак яичников (14). Практический бюллетень американкой коллегии акушеров и гинекологов в 2007 году опубликовал статью, где говорится, что “Период общей выживаемости женщин с опухолями яичников, проходящих лечение у врачей специалистов-онкологов с опытом лечения рака яичников, таких как онкогинекологи, значительно больше по сравнению с периодом выживаемости пациенток, больных раком яичников, проходящих лечение у гинекологов” (15). Так как большая часть выявленных случаев образований в малом тазу доброкачественные, очень важно до проведения операции оценить риск присутствия злокачественной опухоли, для правильного выбора тактики лечения (15).

С 1988 года определение уровня CA125 в сыворотке, УЗИ обследование, а также КТ, МРТ и КТ/ПЭТ являлись стандартами для определения является ли образование подозрительным на злокачественное (16). Хотя литература переполнена статьями с описаниями, какой из методов наиболее точен, комбинация физического осмотра, измерение CA125 и метода визуализации обладает максимальной положительной прогностической ценностью (17-19). Для улучшения этой триады у пациенток с образованиями в малом тазу может быть использовано иммуноферментное определение HE4 в сочетании с методами ARCHITECT CA 125 II, CanAg CA125 EIA или Lumipulse G CA125II, с целью оценки риска эпителиального рака яичника. Результаты должны интерпретироваться в сочетании с другими методами в соответствии со стандартными клиническими тактиками. Дополнительное использование HE4 EIA — это помощь в мониторинге ответа на терапию для пациентов с инвазивным эпителиальным раком яичников. Результаты должны интерпретироваться в совокупности с результатами других обследований, используемых для диагностики рака яичников.

Принцип метода

Настоящий набор HE4 EIA является твердофазным, неконкурентным иммуноферментным иммунологическим анализом, основанным на прямой “сэндвич” технологии, с использованием двух типов моноклональных мышиных антител 2H5 и 3D8 к двум различным эпитопам C-WFDC домена молекулы HE4. Калибраторы, контроли и образцы пациентов инкубируют вместе с биотинилированными анти-HE4 моноклональными антителами 2H5 в покрытых стрептавидином лунках микропланшета. В процессе инкубации HE4, содержащийся в калибраторах, контролях или образцах пациентов, сорбируется на покрытых стрептавидином лунках микропланшета с биотинилированными анти-HE4 моноклональными антителами. Стрипы затем промывают и инкубируют с пероксидазой хрена, меченной анти-HE4 моноклональными антителами 3D8. После промывки в каждую лунку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции в присутствие антигена развивается голубое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена HE4 в образце. Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном спектрофотометре с фильтром 620 нм (или, что необязательно, при 405 нм после добавления стоп-раствора).

Калибровочные кривые строятся для каждого анализа в координатах: оптическая плотность против концентрации для каждого калибратора. Концентрация HE4 в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

Реагенты

- Каждый набор HE4 EIA содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на этикетке на внешней стороне упаковки.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8ºC. Не замораживайте!
- Сроки хранения вскрытых реагентов при условии, что реагенты не были контаминированы, хранились в плотно закрытых оригинальных упаковках и использовались так, как описано в данной инструкции, указаны в таблице. Верните оставшиеся реагенты в холодильник на 2-8°C немедленно после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
Микропланшет	1 микропланшет	2-8ºC до истечения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

срока годности, указанного на планшете

12x8 разделяемых лунок, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем. Тщательно закройте пакет и храните сухим.

Калибратор HE4 A 1x 8 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Калибратор находится в солевом растворе фосфатного буфера с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и антимикробным консервантом, не содержащим азида натрия. Готов к использованию. Калибратор А должен также использоваться для разведения образцов.

Калибраторы HE4 B–F, 5 флаконов, лиофилизированные

Стабильность после растворения: 4 недели при 2-8°C
4 месяца при -20°C или ниже

HE4	B	1 x 1 мл
HE4	C	1 x 1 мл
HE4	D	1 x 1 мл
HE4	E	1 x 1 мл
HE4	F	1 x 1 мл

Лиофилизированные калибраторы, содержат антиген HE4 в фосфатном буфере, с бычьим сывороточным альбумином, инертным желтым красителем и антимикробным консервантом, не содержащим азида натрия. Перед использованием должны быть растворены в дистиллированной или деионизированной воде.

ЗАМЕЧАНИЕ: точные концентрации HE4 специфичны для каждого лота и указаны на этикетке каждого флакона.

Контроли HE4 2 флакона, лиофилизированные

Стабильность после растворения: 4 недели при 2-8°C
4 месяца при -20°C или ниже

HE4	контроль 1	1 x 1 мл
HE4	контроль 2	1 x 1 мл

Лиофилизированные контроли содержат антиген HE4 в человеческой сыворотке и антимикробным консервантом, не содержащим азида натрия. Перед использованием должны быть растворены в дистиллированной или деионизированной воде.

Биотинилированные Анти - HE4 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Биотинилированные мышиные моноклональные анти-HE4 антитела, ≈ 1 мкг/мл.

Содержат солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, детергентами, инертным красным красителем и антимикробным консервантом, не содержащим азида натрия. Готовы к использованию.

Трейсер 1 x 0.75 мл 2-8ºC до истечения
HRP-анти HE4 срока годности, указанного на флаконе

Сток-раствор пероксидазы хрена с анти-HE4 моноклональными антителами мыши, ≈ 40 мкг/мл. Содержит антимикробный консервант, не содержащий азида натрия. Должен быть разбавлен перед использованием разбавителем трейсера.

Разбавитель трейсера 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Солевой раствор фосфатного буфера (pH 7.2) с бычьим сывороточным альбумином, блокирующими агентами, детергентами, голубым инертным красителем и антимикробным консервантом, не содержащим азида натрия. Готов к использованию

HRP-**Субстрат ТМБ** 1x 12 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3,3',5,5'тетраметилбензидина (ТМБ). Готов к использованию.

Стоп-раствор 1 x 15 мл 2-8ºC до истечения срока годности указанного на флаконе

0.12 М раствор соляной кислоты. Готов к использованию

Концентрат буфера для промывок 1 x 50 мл 2-8ºC до истечения срока годности, указанного на флаконе

ТРИС-HCl буферный солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта. Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой.

Показатели нестабильности

Раствор HRP-субстрата ТМВ должен быть бесцветный или слегка голубоватый. Голубой цвет свидетельствует о загрязнении реагента и раствор должен быть выброшен.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики In Vitro:

• Следуйте указаниям, приведенным в настоящей инструкции. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если анализ выполнен с какими-либо отклонениями от инструкции, прилагаемой к набору.

• Обращайтесь с образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными. С реагентами, содержащими компоненты человеческого происхождения, и с образцами человеческого происхождения рекомендуется обращаться согласно Стандарту OSHA по работе с патогенами (20). При работе с материалами, содержащими или потенциально содержащими инфекционные агенты необходимо соблюдать уровень безопасности 2 (21) или другой соответствующий уровень безопасности.

• Следуйте принятым инструкциям при утилизации всех отработанных материалов.

Внимание:

Для всех материалов человеческого происхождения, используемых при изготовлении реагентов данного набора, были получены отрицательные результаты тестирования на антитела к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Но, так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие инфекционных заболеваний, передающихся с кровью, то со всеми материалами человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

Сбор и подготовка образцов

Данный набор HE4 EIA разработан для использования сыворотки (включая сыворотку, собранную в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сепарационные пробирки, SST). Возможность использования образцов плазмы или других биологических жидкостей не была валидирована для данного метода HE4 EIA. Соберите кровь из вены методом венепункции и следуйте инструкции производителя пробирок. При проведении серии определений необходимо выполнять анализ одного типа образцов.

Сыворотку можно хранить при 2—8°C в течение 3 дней до анализа. Для более длительного хранения образцы необходимо хранить при температуре -40°C или ниже.

Перед анализом все образцы должны достичь комнатной температуры. Тщательно перемешайте образцы перед анализом, несколько раз аккуратно переворачивая пробирки. Образцы, содержащие видимые частицы, должны быть центрифугированы перед анализом на режиме 10 000 x g в течение 10 минут для удаления частиц, которые могут появиться при размораживании образцов.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не входящие в комплект поставки

1. Микропланшетный шейкер.
   Встряхивание должно быть средним или энергичным, около 700-1100 колебаний/мин.
2. Микропланшетный вошер
   Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять 1, 3 и 6 циклов промывки с минимальным объемом заполнения 350 мкл в лунку на цикл промывки. Если нет автоматического промывающего устройства, рекомендовано использовать 8-канальную пипетку с одноразовыми пластиковыми наконечниками для внесения 350 мкл.
3. Микропланшетный спектрофотометр
   с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания оптической плотности от 0 до 3.0.
4. Высокоточные пипетки
   с одноразовыми пластиковыми наконечниками для дозирования микрообъемов жидкостей
   8-канальная пипетка или наконечники для диспенсеров со сменными пластиковыми наконечниками для 100 мкл рекомендуется, но не обязательна. Пипетки для дозирования объемах в миллилитрах.
5. Дистиллированная или деионизированная вода.
   Для растворения калибраторов HE4 и контролей HE4, для приготовления разведенного буфера для промывок.

Замечания по процедуре анализа

1. Для получения точных результатов важно хорошо понимать настоящую инструкцию и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов.
   Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
1. Перед использованием реагенты должны достичь комнатной температуры (20-25ºC). Замороженные образцы после оттаивания должны быть медленно и аккуратно перемешаны вручную. **Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25ºC.**
2. Перед внесением калибраторов и образцов пациентов в лунки рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
3. Качественная, тщательная промывка для отделения связанных и несвязанных антигенов и реагентов от комплексов антиген-антитело, связанных с твердой фазой, является одним из наиболее важных этапов ИФА анализа.
   Чтобы обеспечить эффективную промывку, убедитесь в том, что во время каждого цикла промывки все лунки полностью заполняются, до верхнего края, буфером для промывок, что буфер для промывок вносится с хорошей скоростью потока, что аспирация жидкости из лунок между и по окончании циклов промывки выполняется полностью, и лунки пустые. Если в лунках остаётся жидкость, переверните микропланшет и осторожно постучите им по фильтровальной бумаге.
   - Автоматическая промывка (с использованием вошера): следуйте инструкциям производителя по тщательной очистке и уходу и проводите необходимое количество циклов промывки до и после каждого этапа инкубации. Вошер не следует оставлять с на длительное время заполненным буфером для промывок, так как иглы могут забиться, что приведет к плохому внесению и аспирации жидкости.
4. TMB HRP-субстрат очень чувствителен к загрязнению. Для лучшей стабильности TMB HRP-субстрата, чтобы избежать загрязнения реагента налейте необходимое количество реагента из флакона в тщательно очищенный резервуар или, предпочтительно, в одноразовую пластиковую ванночку. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток (или наконечники для диспенсеров).
5. Обязательно используйте чистые одноразовые пластиковые наконечники для пипеток и правильную технику дозирования при работе с образцами и реагентами. Избегайте переноса материала из лунки в лунку, для этого не прикасайтесь к поверхности жидкости. Правильный метод дозирования имеет особое значение при работе с раствором субстрата TMB.

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
Калибраторы HE4 B–F	4 недели при 2-8°C 4 месяца при -20°C или ниже
Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Замечание: точные концентрации калибраторов HE4 указаны на этикетке каждого флакона и должны быть использованы для расчета результатов.

Контроли HE4 1 и 2

4 недели при 2-8°C
4 месяца при -20°C или ниже

Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон и тщательно перемешайте. Оставьте не меньше чем на 15 минут при комнатной температуре, для полного растворения, и тщательно перемешайте перед использованием.

Замечание: допустимые диапазоны концентрации контролей указаны на этикетке каждого флакона.

Буфер для промывок 2 недели при 2 - 25ºC в герметичном контейнере

Налейте 50 мл буфера для промывок в чистый контейнер и разведите в 25 раз, добавив 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения готового буфера для промывок.

Рабочий раствор трейсера 4 недели при 2 - 8ºC в герметичном контейнере

Приготовьте нужный объем рабочего раствора трейсера смешиванием 50 мкл трейсера, HRP анти-HE4 с 1 мл разбавителя трейсера на стрип (см. нижеприведенную таблицу и протокол).

Кол-во стрипов	Раствор трейсера , HRP анти-HE4(мкл)	Разбавитель 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

Удостоверьтесь, что используются только чистые пластиковые или стеклянные сосуды для приготовления рабочего раствора трейсера.

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с трейсером, HRP анти-HE4 во флакон с разбавителем трейсера и осторожно перемешайте. Убедитесь, что весь раствор трейсера перенесен во флакон с разбавителем трейсера.

Замечание: Рабочий раствор трейсера стабилен 4 недели при хранении при 2-8ºC. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Измерения калибраторов, контролей и образцов пациентов рекомендуется выполнять в дублях. Калибровочная кривая должна строиться для каждого анализа. Все реагенты и образцы перед проведением анализа должны достичь комнатной температуры (20-25ºC).

1. Начните с приготовления калибраторов B-F, контролей 1 и 2, буфера для промывок и раствора антител. Очень важно использовать только чистые контейнеры. Тщательно соблюдайте данную инструкцию.
2. Установите требуемое количество стрипов в рамке-держателе. (сразу верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно закройте его.) Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Внесите 25 мкл калибраторов HE4 (кал.), контролей (к) и образцов пациентов (обр.) в лунки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т. д.
A	кал. A	кал. E	обр. 1		
B	кал. A	кал. E	обр. 1		
C	кал. B	кал. F	обр. 2		
D	кал. B	кал. F	обр. 2		
E	кал. C	К. 1	и т. д.		
F	кал. C	К. 1			
G	кал. D	К. 2			
H	кал. D	К. 2			

4. Внесите 100 мкл раствора биотинилированных антител HE4 в каждую лунку, используя 1 - или 8-канальную пипетку на 100 мкл. Избегайте переноса жидкостей между лунками, держите наконечник пипетки чуть выше края лунки и избегайте касания стрипов или поверхности жидкости..
5. Инкубируйте стрипы 1 час (± 10 минут) при комнатной температуре (20-28ºC) с постоянным перемешиванием микропланшета на шейкере.
6. После первой инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 3 раза, как описано в п. 4 раздела ”Замечания по процедуре анализа”.
7. Внесите в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора трейсера в той же последовательности, как в шаге 4.
8. Инкубируйте стрипы в течение 1 часа (± 5 мин.) при комнатной температуре (20-25ºC) с постоянным перемешиванием.
9. После второй инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз, как описано в п. 4 раздела ”Замечания по проведению анализа”.
10. Внесите в каждую лунку по 100 мкл субстрата ТМБ в той же последовательности, как в шаге 4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, чтобы время между добавлением в первую и последнюю лунку не превышало 5 минут.
11. Инкубируйте 30 минут (± 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Избегайте попадания прямого солнечного света.
12. Немедленно считайте оптическую плотность на микропланшетном спектрофотометре при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет микропланшетного спектрофотометрического ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена, как описано в этапе 12альт.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12альт. Добавьте 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте. После этого в течение 15 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Диапазон измеряемых значений

С помощью данного набора HE4 EIA могут быть измерены концентрации в диапазоне от 15 до 900 pM. Если концентрация HE4 в образце превышает измеряемый диапазон, перед анализом образец необходимо развести калибратором «0» (см. раздел "Расчет результатов для разведенных образцов ").

Контроль качества

Для контроля качества измерений должны быть использованы контроли HE4 1 и 2, поставляемые в наборе. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.

Результаты измерения HE4 данным методом считаются достоверными, если:

- Средние значения дублей, полученные для контролей, попадают в диапазон допустимых значений.
- Коэффициент вариации (CV) дублей калибраторов B-F и контролей не превышает 15%.
- Разница значений оптической плотности дублей стандарта A (ноль) составляет не более 0.06 оптических единиц.

Если в ходе исследования получены недостоверные результаты для калибраторов или контролей, необходимо полностью проверить все реагенты и оборудование, точность пипеток, правильность работы ридера и вошера и повторить анализ. Каждой лаборатории рекомендуется приготовить свои собственные пулы сывороток с различными уровнями, которые можно использовать для внутреннего контроля качества исследований.

Референсные материалы

Так как не существует международного референсного стандарта для антигена HE4, значения калибраторов данного набора HE4 EIA были установлены по набору внутренних стандартов производителя.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если используется микропланшетный спектрофотометрический ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого калибратора HE4, указанную на этикетке.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубическим сплайном. Калибратор A должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 pM.
- Интерполяция от точки к точке. Калибратор A должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 pM.
- Квадратичная регрессия. Калибратор A должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 pM.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

Для ручных расчетов калибровочная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (A), полученных для каждого калибратора против соответствующих концентраций HE4 (в pM) (см. рисунок ниже). Значения концентраций HE4 в образцах для каждого пациента находят по калибровочной кривой, используя оптическую плотность образца.

Расчет результатов для разведенных образцов

Если образец дает значение HE4 больше 900 pM, необходимо разбавить его в 10 или 100 раз нулевым калибратором.

Разбавление в 10 раз = 50 мкл образца + 450 мкл калибратора A

Разбавление в 100 раз = 50 мкл разбавленного в 10 раз образца + 450 мкл калибратора A

Концентрация HE4 в исходных образцах рассчитывается следующим образом:

Разбавление в 10 раз: 10 x Полученное значение

Разбавление в 100 раз: 100 x Полученное значение

Алгоритм расчета значения ROMA

Расчет значения ROMA (Риск злокачественной опухоли яичника/ Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) для образца сыворотки включает определение HE4, CA125 и оценку менопаузного статуса.

Расчет прогностического индекса (ПИ)

Прогностический индекс (ПИ) рассчитывается для женщин в пременопаузе и постменопаузе раздельно, с использованием уравнений (1) и (2), приведенных ниже. Для расчета ПИ значения, полученные при анализе методом HE4 EIA и либо методом ARCHITECT CA125 II, либо методом CanAg CA125 EIA или Lumipulse G CA125II, подставляются в соответствующее уравнение алгоритма, приведенное ниже, в зависимости от менопаузального статуса женщины.

(1) Женщины в пременопаузе

Прогностический индекс (ПИ) = -12.0 + 2.38*ln[HE4] + 0.0626*ln[CA125]

(2) Женщины в постменопаузе

Прогностический индекс (ПИ) = -8.09 + 1.04*ln[HE4] + 0.732*ln[CA125]

(ln – натуральный логарифм)

Расчет значения ROMA

Для расчета значения показателя ROMA (т. е. предсказательного значения), внесите рассчитанное значение Прогностического индекса (ПИ) в следующее уравнение (3):

(3) Значение ROMA (%) = exp(ПИ) / [1 + exp(ПИ)] *100

Примеры ниже могут служить для валидации расчета значений ПИ и ROMA:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Менопаузальный статус	HE4 (pM)	CA125 (Ед/мл)	Расчет ПИ	ПИ	ROMA, %
Пременопауза	37.5	74.9	-12.0+(2.38*3.624) + (0.0626* 4.316)	-3.10388	4.29
Пременопауза	386.6	21.8	-12.0+(2.38*5.957) +(0.0626*3.082)	2.371517	91.5
Постменопауза	66.7	11.3	-8.09+(1.04*4.200) +(0.732*2.425)	-1.94683	12.5
Постменопауза	383.1	22.7	-8.09+(1.04*5.948) +(0.732*3.122)	0.381799	59.4

Ограничения метода

У пациенток с подтвержденным диагнозом рак яичника значения HE4 могут находиться в одном диапазоне со значениями, определяемыми у здоровых женщин. Отдельные гистологические типы рака яичника, такие как герминогенные и мукоидные, редко экспрессируют HE4, следовательно, HE4 не рекомендуется для мониторинга пациенток с диагностированными герминогенными или мукоидными опухолями яичников (7). И наоборот, повышенные уровни антигена HE4 могут присутствовать у женщин, не страдающих злокачественными заболеваниями. Следовательно, уровень HE4 не может быть использован как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественного заболевания и определение HE4 не должно использоваться для скрининга рака. При постановке диагноза и мониторинге заболевания результаты анализа должны интерпретироваться в совокупности с результатами других исследований и диагностических процедур, тест HE4 не должен заменять какую-либо установленную клиническую процедуру.

Алгоритм расчета риска злокачественной опухоли яичника не был валидирован для следующих групп пациенток:

Женщины, уже проходившие курс лечения по поводу злокачественной опухоли

Женщины, проходящие курс химиотерапии

Пациентки младше 18 лет.

Форма математической функции расчета ROMA зависит от статуса женщины пременопауза/менопауза. Определение этого статуса должно быть основано на оценке овариальной функции по клинической информации и анамнезу.

Показатель ROMA не включает возраст, семейный анамнез, клинические данные или результаты визуализации, его значение должно интерпретироваться в совокупности с этими параметрами.

Ошибка анализа HE4 EIA и/или CA125, или ошибка в расчете результатов может привести к неправильной оценке риска и несоответствующему ведению больной. Особенно ложные низкие результаты анализа могут привести к определению пациентки в группу низкого риска наличия эпителиального рака яичников, что может привести к неспецифическому лечению.

Использование результатов без учета других лабораторных исследований, данных методов визуализации и клинических оценок может быть рискованным.

Антитела к реагентам (человеческие антимышиные антитела (HAMA) или гетерофильные антитела), присутствующие в образцах сывороток пациенток, иногда могут влиять на результаты анализа, даже несмотря на то, что в буферы включены блокирующие агенты.

Биотин может интерферировать в этом анализе с ложноотрицательными результатами. Следует учитывать пациентов, принимающих пищевые добавки или получающих терапию с высоким содержанием (> 5 мг/день) или крайне высоким содержанием (> 300 мг/день) биотина. Пиковые уровни в сыворотки наблюдаются после 1-3 часов после приема, и физиологический срок полувыведения достигает 8-16 часов в зависимости от функции почек (26, 27). В исследовании Grimsey и др. (26) концентрация образца 30 нг/мл была достигнута через 8 часов после приема 10 мг биотина. Пациентам, принимающим очень высокие дозы биотина, рекомендуется прекратить прием биотина, по крайней мере, на 2 дня перед сбором крови для анализа (28).

Анализ необходимо выполнять при контролируемой температуре окружающей среды, так как инкубация при температуре выше рекомендованной 20-25°C может привести к получению ложно заниженных результатов.

Ожидаемые значения

Были оценены уровни HE4 в 1983 образцах, результаты приведены ниже:

Распределение уровней HE4					
Количество пациентов/уровень	число	0 - 150 pM	150.1-300 pM	300.1-500 pM	≥ 500 pM
ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫЕ ЖЕНЩИНЫ					
Пременопауза	*423*	416 (98%)	4 (0.9%)	0 (0.0%)	3 (0.7%)
Постменопауза	*443*	424 (96%)	16 (3.6%)	2 (0.5%)	1 (0.2%)
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ					
Беременность	*22*	21 (95 %)	1 (4,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Доброкачественные новообразования яичников	*347*	324 (93%)	18 (93%)	1 (0.3%)	4 (1.2%)
Другие доброкачественные новообразования	*107*	81 (76%)	8 (7.5%)	7	11 (10%)
Гипертония/ застойная сердечная недостаточность	*96*	75 (78%)	16 (17%)	2 (2.1%)	3 (3.1%)
РАК					
Рак яичников	*127*	27 (21%)	18 (14%)	21 (16%)	61 (48%)
Рак молочной железы	*46*	40 (87%)	4 (8.7%)	2 (4.3%)	0 (0.0%)
Рак легких	*50*	28 (56%)	16 (32%)	6 (12%)	0 (0.0%)
Рак эндометрия	*116*	203 (76%)	36 (14%)	11 (4.1%)	16 (6.0%)
Рак ЖКТ	*56*	47 (84%)	8 (14%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)

Распределение уровней HE4 у практически здоровых лиц в зависимости от возраста

Возраст (Лет)	N	Результаты HE4 (pM)	
		Медиана	95 перцентиль
< 40	316	47.6	81.6
40–49	110	48.2	110.6
50–59	179	52.5	104.4
60–69	208	60.7	113.0
≥70	53	91.1	233.3

В данном исследовании у 98% здоровых женщин в период пременопаузы уровень HE4 был ниже 150 pM и у 96% здоровых женщин в период постменопаузы уровень HE4 был ниже 150 pM. Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон для обследуемой популяции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Мониторинг заболевания у пациенток с установленным диагнозом рак яичника

Эффективность использования HE4 EIA в качестве вспомогательного средства для мониторинга рака яичников оценивали у 80 пациенток. С этой целью сравнивали изменения концентрации HE4 в образцах сывороток с изменениями состояния больных. Всего было изучено 354 парных данных, в среднем по 4.4 для каждой пациентки. Положительное изменение уровня HE4 было определено как повышение значения не менее чем на 25% по сравнению с предыдущим результатом анализа. Такое изменение учитывает и вариабельность метода, и биологические колебания. Для 60% (76 из 126) образцов сывороток пациенток с положительными изменениями наблюдалась корреляция с прогрессией заболевания. В 75% случаев (171 из 228) отсутствие значительных изменений уровня HE4 совпадало с отсутствием прогрессии. Общая сходимость составила 70% (247/354). В таблице ниже приведены данные в формате 2x2.

Изменение состояния по последовательным парам			
Повышение концентрации HE4	**Прогрессия**	**Нет прогрессии**	**Всего**
>25%	76	57	133
≤ 25%	50	171	221
всего	126	228	354

В таблице ниже приведено распределение пациенток. 93% (54/58) парных образцов сывороток пациенток с положительными изменениями коррелировали с прогрессией заболевания, тогда как для 32% (7/22) парных образцов, в которых отсутствовали значительные изменения уровня HE4, наблюдалась корреляция с отсутствием прогрессии. Общая сходимость составила 76% (61/80).

Изменение состояния пациенток			
Повышение концентрации HE4	прогрессия	Нет прогрессии	всего
>25%	54	15	69
≤ 25%	4	7	11
всего	58	22	80

Оценка риска у пациенток с новообразованиями в малом тазу.

Эффективность использования HE4 EIA в комбинации с CA125, измеренным либо методом ARCHITECT CA125 II, либо методом CanAg CA125 EIA или Lumipulse CA125 II, для оценки риска наличия эпителиального рака яичника у пациенток с образовании в малом тазу определяли в проспективном двойном слепом клиническом многоцентровом исследовании. Был разработан алгоритм (ROMA, см. выше) для оценки риска эпителиального рака яичника. Алгоритм учитывает значения концентраций HE4 и CA125, а также менопаузальный статус пациентки. Алгоритм позволяет рассчитать вероятность обнаружения эпителиального рака яичника при хирургическом вмешательстве. В проспективное исследование были включены 502 пациентки и для них были определены вероятность рака яичника и возможность разделения на группы высокого и низкого риска на основании рассчитанного значения ROMA.

На рисунках ниже приведены кривые распределения частот значений ROMA для доброкачественных и злокачественных случаев, включая опухоли с низким потенциалом малигнизации (LMP), которые получены с использованием описанного алгоритма. Рисунки 1 и 2 – для результатов исследований методами HE4 EIA и ARCHITECT CA125 II, рис. 3 и 4 – для результатов исследований методами HE4 EIA и CanAg CA125 EIA.

Сочетание методов HE4 EIA + Lumipulse G CA125II и HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II показало сходную частоту распределений. На графиках показаны частоты распределений пациентов с доброкачественными новообразованиями и раком эпителия яичников, включая опухоли LMP в зависимости от cut-off уровней ROMA.

Рис. 1 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в **пременопаузе.** Комбинация методов HE4 EIA + **ARCHITECT CA125 II**

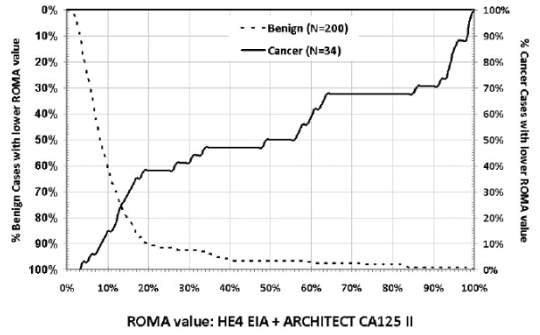


Рис. 2 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в **постменопаузе.** Комбинация методов HE4 EIA + **ARCHITECT CA125 II**

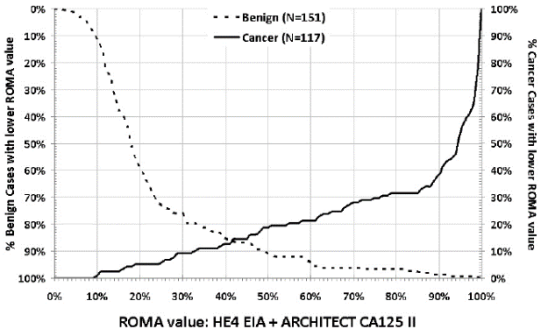


Рис. 3 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в **пременопаузе.** Комбинация методов HE4 EIA + CanAg CA125

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

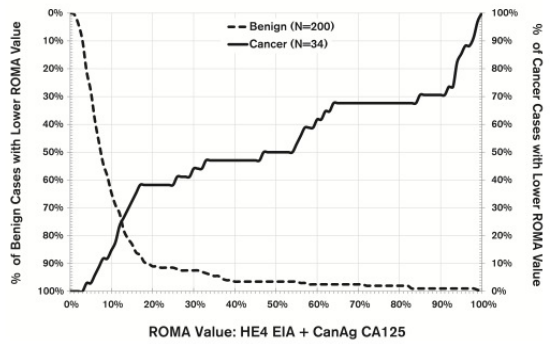
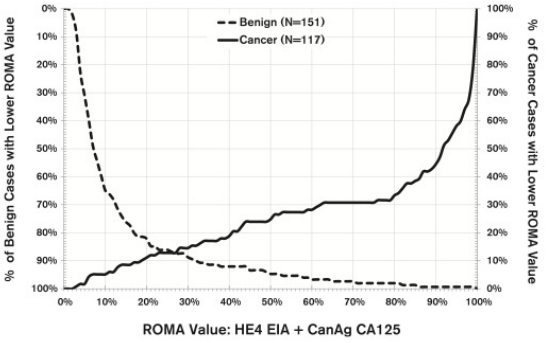


Рис. 4 Кривая распределения частот значений ROMA для женщин в **постменопаузе.** Комбинация методов HE4 EIA + CanAg CA125



Стратификация риска – группы высокого и низкого риска

Алгоритм риска злокачественной опухоли яичника использован для распределения пациенток по группам риска обнаружения эпителиального рака яичника. Для обеспечения уровня специфичности 75% были использованы следующие точки отсечения. ***Следует отметить, что в зависимости от того, какой анализ на CA125 используется, необходимо выбирать различные точки отсечения для стратификации риска на группы высокого и низкого риска.***

При специфичности 75% для комбинации методов **HE4 EIA + ARCHITECT CA125 II** были использованы следующие уровни:

Женщины в пременопаузе

Значения ROMA ≥ 13.1% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 13.1% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Женщины в постменопаузе

Значения ROMA ≥ 27.7% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 27.7% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

При специфичности 75% для комбинации методов **HE4 EIA + CanAg CA125** были использованы следующие уровни:

Женщины в пременопаузе

Значения ROMA ≥ 12.5% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 12.5% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Женщины в постменопаузе

Значения ROMA ≥ 14.4% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 14.4% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

При специфичности 75% для комбинации методов **HE4 EIA + LUMIPULSE G CA125II** были использованы следующие уровни:

Женщины в пременопаузе

Значения ROMA ≥ 13.1% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 13.1% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Женщины в постменопаузе

Значения ROMA ≥ 27.7% = высокий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Значения ROMA < 27.7% = низкий риск обнаружения эпителиального рака яичника

Стратификация риска всех пациенток, имеющих аднексальные образования, при использовании ROMA (специфичность 75%), приведена в таблице 1, включая стратификацию риска отдельно для пациенток в пременопаузе и постменопаузе, соответственно. Чувствительность стратификации пациенток с эпителиальным раком яичников I-IV стадий на группы высокого и низкого риска обнаружения эпителиального рака яичников составила 94% при специфичности 75%, т. е. 75% женщин с доброкачественными образованиями были отнесены к группе низкого риска.

Прогностическая значимость положительного и отрицательного результатов составила 58% и 97%, соответственно.

Таблица 1: Стратификация риска эпителиального рака яичников (EOC) пациенток с выявленными образованиями в малом тазу при использовании комбинации методов HE4 EIA + **ARCHITECT CA125 II** для расчета значения ROMA.

Уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в пременопаузе ≥ 13.1%,

Уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в постменопаузе ≥ 27.7%.

	Женщины в пременопаузе, n = 234	**Женщины в постменопаузе, n = 268**	**Женщины в пре- и постменопаузе, n = 502**
Стадия I – IV EOC и LMP (вместе)	26/34 (76%)	108/117 (92%)	134/151 (89%)
Опухоли с низким потенциалом малигнизации (LMP)	10/16 (63%)	3/6 (50%)	13/22 (59%)
Стадия I-II EOC	6/7 (86%)	24/28 (86%)	30/35 (86%)
Стадия I – IIIC a EOC	7/8 (88%)	35/39 (90%)	42/47 (89%)
Стадия I – IV EOC	16/18 (89%)	105/111 (95%)	121/129 (94%)

a - Стадии I-IIIb и IIIC (сальник – отрицательно; лимфатические узлы - положительно) эпителиального рака яичников

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ложноотрицательные результаты и доля случаев эпителиального рака яичников, распределенных в группу низкого риска среди пациенток, имеющих аднексальные образования, с использованием ROMA при уровне специфичности 75% представлены в таблице 2. Стратификация на группы высокого и низкого риска при использовании алгоритма ROMA при уровне специфичности 75% дала 6,2% ложноотрицательных результатов. Три процента всех случаев, попавших в группу низкого риска, были представлены раком яичников.

Таблица 2. Ложноотрицательное отношение и доля случаев с раком яичников среди всех случаев, попавших в группу низкого риска среди пациентов, имеющих аднексальные новообразования, с использованием ROMA.
Уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в пременопаузе < 13.1%,
уровень cut-off при 75% специфичности для женщин в постменопаузе < 27.7%.

Эпителиальный рак яичников [a]	Ложноотрицательное отношение (FNR)			Процент рака в группе с низким риском		
	Ложно отрицат.	Общее,		Ложно отрицат	Истинно положит	
	Рак	Рак	FNR [b]	Рак	Доброкачеств	% [c]
Пременопауза	2	18	11.1%	2	149	1.3%
Постменопауза	6	111	5.4%	6	113	5.0%
Все пациентки	8	129	6.2%	8	262	3.0%

a - Опухоли с низким потенциалом малигнизации (LMP) не включены;
FNR [b] = Ложноотрицательные/(Истинно положительные + Ложноотрицательные);
c – Ложноотрицательные/(Истинно отрицательные + Ложно отрицательные)

Не получено статистически достоверной разницы в чувствительности и специфичности значений ROMA, рассчитанных для комбинаций методов ARCHITECT CA125 II, CanAg CA125 EIA или Lumipulse G CA125II для дифференциации между доброкачественными заболеваниями и эпителиальным раком яичников. При использовании комбинации методов CanAg CA125 EIA + HE4 EIA чувствительность для стратификации пациентов высокой группы риска с эпителиальным раком яичников I-IV стадий составила 93%. Прогностическое значение положительного и отрицательного результатов составила 57% и 97%, соответственно. При использовании комбинации методов Lumipulse G 125II + HE4 EIA чувствительность для стратификации пациентов с эпителиальным раком яичников I-IV стадий в группу с высоким риском составила 93%. Прогностическое значение положительного и отрицательного результатов составила 58% и 97%, соответственно.

Характеристики метода
Точность
Общая точность метода определения HE4: CV ≤ 15%. Исследования были выполнены согласно руководству NCCLS EP5-A2 (22). Была протестирована панель из 4 образцов сывороток, с использованием наборов двух лотов, в дублях, по две постановки в день, в течение 20 дней. Данные этого исследования приведены в таблице ниже.*

образец	Лот набора	n	Средняя концентрация, pM	SD (pM) внутри серии	CV (%) внутри серии	Общее SD (pM)	Общий CV, %
1	1	80	50.3	0.81	1.6	2.34	4.7
	2	80	48.0	0.69	1.4	2.17	4.5
2	1	80	75.3	1.81	2.4	2.96	3.9
	2	80	72.4	1.73	2.4	4.70	6.5
3	1	80	255	5.68	2.2	12.0	4.7
	2	80	242	5.21	2.2	12.8	5.3
4	1	80	407	6.22	1.5	14.5	3.6
	2	80	385	8.71	2.3	21.6	5.6

**Репрезентативные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.*

Предел обнаружения
Предел обнаружения метода HE4 EIA составляет ≤ 15 pM. Предел обнаружения (ПО) соответствует верхнему пределу 95% доверительного интервала и представляет собой наименьшую концентрацию антигена HE4, которая отлична от нуля. Для определения метода оценки ПО было использовано руководство NCCLS, EP17-A (23). В проведенном исследовании HE4 калибратор A (ноль) и 4 образца сыворотки здоровых женщин были разведены до 5 pM буфером для разведения образцов и проанализированы в 4 постановках по 24 реплики в каждой, в два дня. ПО был рассчитан следующим образом:
ПО (pM) = 5.0 pM x (1.65 x SD_0 + 1.65 x SD_5) / (OD_5 - OD_0)
Рассчитанный предел обнаружения набора HE4 EIA составил < 2.5 pM.

Функциональная чувствительность
Функциональная чувствительность метода HE4 EIA составляет ≤ 25 pM. Функциональная чувствительность выражена как концентрация аналита, при которой CV составляет 20%. Для определения метода оценки функциональной чувствительности было использовано руководство NCCLS, EP5-A2 (22). В проведенном исследовании образцы были проанализированы в 2 постановках по 4 повтора в каждой, в 20 разных дней с использованием двух лотов реагентов.
Рассчитанная функциональная чувствительность набора HE4 EIA составила < 5 pM.

Извлечение
Среднее извлечение набора HE4 EIA составляет 100 ± 15%. В проведенных исследованиях образцы сывороток пациенток с известными концентрациями HE4 были добавлены к нормальным образцам человеческой сыворотки. Концентрации HE4 определяли с использованием данного метода HE4 EIA, а затем рассчитывали процент извлечения. Представительные данные этого исследования приведены в таблице ниже*.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец	Эндогенное значение, pM	Добавленный HE4 антиген, pM	Наблюдаемое значение HE4, pM	Извле-чение **, %
1	44.6	15	60.6	102
		75	96.0	89
		350	397	96
		650	686	96
2	41.1	15	55.7	99
		75	95.2	91
		350	400	98
		650	657	93
3	40.6	15	54.0	97
		75	95.1	91
		350	403	99
		650	680	96
4	46.6	15	63.3	103
		75	106	97
		350	410	99
		650	645	90
5	40.2	15	56.5	102
		75	102	98
		350	402	99
		650	676	96

Среднее извлечение по четырем различным обогащенным концентрациям, приведенным выше, составило 97%.

*Репрезентативные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

** % извлечения = наблюдаемая концентрация HE4 (pM) / эндогенная концентрация HE4 (pM) + добавленный HE4 (pM)

Хук-эффект

Эффект высоких концентраций (Хук-эффект) – это феномен, когда при очень высоких концентрациях аналита образец может измеряться в пределах диапазона измеряемых значений метода. Для метода HE4 EIA Хук-эффект не был обнаружен до концентрации 300 000 pM нативного антигена HE4.

Линейность разведения

В среднем линейность разведения метода HE4 EIA составила 100 ± 15%. Исследование было проведено согласно руководству NCCLS (CLSI), EP6-A (24). Образцы сывороток с повышенными уровнями HE4 были разведены HE4 калибратором A (ноль). Концентрация HE4 была определена для каждого разведения и был рассчитан процент (%) извлечения. Представительные данные этого исследования приведены в таблице ниже*.

образец	Коэффициент конечного разведения	Полученное значение (pM)	Ожидаемое значение (pM)	извлечение** (%)
1	Без разведения	889.6	889.6	100
	1:1.25	720.0	711.7	101
	1:1.7	543.1	533.8	101
	1:2	450.6	444.8	101
	1:2.5	345.9	355.8	97.2
	1:5	183.6	177.9	103
	1:10	97.6	89.0	109
	1:20	49.1	44.5	110
	1:40	25.9	22.2	116
2	Без разведения	697.0	697.0	100
	1:1.25	544.9	557.6	97.7
	1:1.7	429.8	418.2	103
	1:2	361.1	348.5	104
	1:2.5	275.9	278.8	99.0
	1:5	134.5	139.4	96.5
	1:10	74.4	69.7	107
	1:20	39.1	34.9	112
	1:40	21.0	17.4	120
3	Без разведения	680.2	680.2	100
	1:1.25	499.7	544.2	91.8
	1:1.7	354.4	408.1	86.8
	1:2	296.7	340.1	87.2
	1:2.5	247.2	272.1	90.9
	1:5	124.9	136.0	91.8
	1:10	61.7	68.0	90.7
	1:20	34.6	34.0	102
	1:40	18.4	17.0	109

В среднем для представленных разведений трех образцов извлечение = 101%

* Репрезентативные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

** - % извлечения = полученная концентрация HE4 x коэффициент разведения / концентрация HE4 неразведенного образца.

Аналитическая специфичность

В среднем аналитическая специфичность метода HE4 EIA составила 100 ± 15%. Были проведены сравнительные исследования образцов, содержащих соединения, перечисленные ниже, в указанных концентрациях, и контрольных образцов сывороток. Для определения метода оценки интерференции было использовано руководство NCCLS, EP7-A (25). Все вещества в протестированных концентрациях не оказывали влияния на результат анализа.

Эндогенные потенциально влияющие вещества сыворотки	Проверенные концентрации
Триглицериды	30 мг/мл
Билирубин	0.2 мг/мл
Гемоглобин	10 мг/мл
Общий белок	120 мг/мл

Химиотерапевтические потенциально влияющие лекарственные препараты	Проверенные концентрации
Карбоплатин	500 мкг/мл
Цисплатин	165 мкг/мл
Клотримазол	0.3 мкг/мл
Циклофосфамид	500 мкг/мл
Дексаметазон	10 мкг/мл
Доксорубицин	1.16 мкг/мл
Лейковорин	2.68 мкг/мл
Мелфалан	2.8 мкг/мл
Метотрексат	45 мкг/мл
Паклитаксел	3.5 нг/мл

Интерференция с биотином

Проводилось исследование для оценки интерференции биотина. В контрольные образцы с высоким и низким уровнем добавлялся биотин в концентрациях 15, 30, 60 и 600 нг/мл. Средняя концентрация HE4 была определена для каждого образца, и процент извлечения для каждой концентрации биотина был рассчитан по формуле: Извлечение, % = 100 x (Средняя конц. HE4 с добавкой биотина / Средняя конц. HE4 с добавкой только разбавителя).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Уровень HE4	Конц. Биотина (нг/мл)	Ожидаемая конц. HE4, pM	Наблюдаемая конц. HE4, pM	Извлечение, %
Низкая	15	80.6	77.0	96
Высокая	15	558	537	96
Низкая	30	81.5	77.3	95
Высокая	30	554	514	93
Низкая	60	73.3	66.1	90
Высокая	60	548	473	86
Низкая	600	73.0	7.30	10
На основе линейного регрессионного анализа самая низкая концентрация биотина, влияющего на результаты данного теста (≥ 10%). составила 53 нг/мл				

Потенциально влияющие клинические состояния

Для дополнительной оценки специфичности, методом HE4 EIA были протестированы образцы, содержащие HAMA и ревматоидный фактор (RF). В 5 образцах, содержащих HAMA и в 5 образцах, содержащих РФ, был проанализирован % извлечения антигена HE4, добавленного в каждый образец в концентрациях приблизительно 50 и 450 pM. Средние результаты анализа извлечения суммированы в таблице, приведенной ниже.*

Клинические состояния	Количество образцов	Среднее извлечение, %
HAMA	5	101
RF	5	95

*Репрезентативные данные; результаты в различных лабораториях могут отличаться от этих данных.

Гарантии

Все характеристики набора, представленные в инструкции, получены при точном соблюдении процедуры метода, описанной в данной инструкции. Любые отклонения или изменения процедуры, не рекомендованные Fujirebio Diagnostics, могут повлиять на результат. В этом случае производитель отказывается от каких-либо гарантий, выраженных либо предполагаемых, или установленных законом, включая подразумеваемые гарантии годности для продажи и соответствия назначению.

Литература

1. Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Gold man B, Friedman E. In silico chromosomal clustering of genes display-ing altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160:35-42.
2. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7:167-174.
3. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (wfdc2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alter-native splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002;21:2768-2773.
4. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular protease inhibitors. *Biol Reprod* 1991;45:350-357.
5. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998;3:86-95.
6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19:847-853.
7. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, Hecht JL. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:2162-2169.
8. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000;60:6281-6287.
9. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY, Hood L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overex pressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999;238:375-385.
10. Gilks CB, Vanderhyden BC, et al. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expres-sion profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96:684-694.
11. Hellstrom I, Raycraft J, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3695-3700.
12. Moore RM, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108:402-408.
13. Bray F, Loos AH, Tognazzo S, La Vecchia C. Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953-2000. *Int J Cancer* 2005;113(6):977-90.
14. National Institutes of Health Consensus Development Conference State-ment. Ovarian Cancer: Screening, treatment and follow-up. *Gynecol Oncol* 1994;55:S4-14.
15. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guideline for Obstetrcian-Gynecologists. Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol* 2007;110:201-213.
16. Finkler NJ, Benacerraf B, Lavin PT, Wojciechowski C, Knapp RC. Compari-son of serum CA 125, clinical impression and ultrasound in the preoperative evaluation of ovarian masses. *Obstet Gynecol* 1988;72:659-64.
17. Maggino T, Gadducci A, D'Addario V, et al. Prospective Multicenter Study on CA 125 in postmenopausal pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1994:54;117-123.
18. Roman LD, Muderspach LI, Stein SM, et al. Pelvic Examination, Tumor marker level, and Gray-Scale and Doppler Sonography in the prediction of pelvic cancer. *Obstet Gynecol* 1997:89;493-500.
19. DePriest PD, Shenson D, Fried A, et al. A morphology index based on sono graphic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51:7-11.
20. US Department of Labor, Occuptional Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
21. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determinination of Limits of Detection and Limits of Quantita-tion; Approved Guideline. EP17-A (2004).
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.
26. Grimsey P et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *J Pharmacokinet.* 2017; 2(4); 247-256.
27. Jenkins Colon P, Greene D.N. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. *JALM* 2018; 2(6); 941-951.
28. Chun KY. Biotin Interference in Diagnostic Tests. *Clinical Chemistry* 2017; 63; 619-620.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

FUJIREBIO®
Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ

HE4 EIA Кат. N 404-10

Подготавливайте компоненты непосредственно перед использованием. Соблюдайте условия промывок и инкубаций в соответствии с данной инструкцией.

Замечание: Для получения точных результатов проводите все этапы анализа при температуре 20-25ºC

Шаг	**Флакон/Планшет**	**Действия**
1. Приготовьте калибраторы HE4 Приготовьте контроли HE4 Приготовьте буфер для промывок Приготовьте рабочий раствор трейсера	CAL | HE4 B, C, D, E, F CONTROL | HE4 1, 2 WASHBUF | 25X CONJ | Anti-HE4 DIL | CONJ	Внесите точно 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон и тщательно перемешайте. Оставьте не меньше чем на 15. **Замечание:** точные концентрации каждого калибратора HE4 указаны на этикетке каждого флакона. Стабильность после растворения: 4 недели при 2-8°C. Разведите 50 мл концентрата буфера для промывок в 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды Смешайте 50 мкл трейсера, HRP анти-HE4 с 1 мл разбавителя трейсера на стрип: **№ стрипа / Трейсер мкл / Разбавитель 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
2. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую лунку один раз буфером для промывок, используя ручной или автоматический вошер.
3. Добавьте калибраторы, контроли и образцы	CAL | HE4 A, B, C, D, E, F CONTROL | HE4 1, 2, образцы	25 мкл в каждую лунку
4. Добавьте биотин/анти-HE4	BIOTIN | Anti-HE4	100 мкл в каждую лунку
5. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре (20-25ºC)
6. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую ячейку 3 раза буфером для промывок, используя ручной или автоматический вошер
7. Добавьте рабочий раствор трейсера	Рабочий раствор трейсера	100 мкл в каждую лунку
8. Инкубация	MICROPLA	1 час, встряхивая при комнатной температуре (20-25ºC)
9. Промывка	MICROPLA	Промойте каждую ячейку 6 раз буфером для промывок, используя ручной или автоматический вошер
10. Добавьте субстрат	SUBS | TMB	100 мкл в каждую лунку
11. Инкубация	MICROPLA	30 минут, встряхивая при комнатной температуре (20-25ºC)
12. Считывание оптической плотности	MICROPLA	620 нм
12a. Добавьте стоп-раствор	STOP	100 мкл в каждую лунку
13a. Перемешивание	MICROPLA	1 мин, встряхивая при комнатной температуре (20-25ºC)
14a. Считывание оптической плотности	MICROPLA	Считайте при 405 нм в течение 15 минут

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль CanChek Tumor Marker, уровень 1 и 2

Кат. N 107-20

LOT 42630		30.06.2022		
		Диапазон допустимых значений:		
CONT		**SCC (мкг/л)**	**NSE (мкг/л)**	**S100B (нг/л)**
3 x 0.75 мл уровень 1	*лот 44445*	1.2 – 2.3	8,6 - 17	85 - 175
3 x 0.75 мл уровень 2	*лот 44446*	12-23	47 - 95	383 - 791

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СИМВОЛЫ

Срок годности	IVD Для диагностики in vitro
LOT Лот (партия)	Температурный режим
Дата производства	Обратитесь к инструкции по использованию
REF (№ по каталогу)	Биологическая опасность
Производитель	CONT Содержимое

Назначение
Контроль CanChek Tumor Marker предназначен для проведения контроля качества лабораторных исследований при количественном определении опухолевых маркеров HCE (нейрон-специфическая енолаза), белка S100B и SCC (антиген плоскоклеточной карциномы).

Введение и принцип метода
Использование контрольных сывороток необходимо для контроля характеристик используемого метода лабораторной диагностики in-vitro и является неотъемлемой частью надлежащей лабораторной практики (GLP). CanChek включает контрольные сыворотки двух уровней, что позволяет проводить контроль качества исследований на всем клинически значимом диапазоне.

Реагенты
Контроль CanChek Tumor Marker изготовлен с использованием человеческой сыворотки, с добавлением человеческих белков, наполнителей и консервантов. Контрольные материалы должны быть разведены дистиллированной водой перед использованием.

Хранение и стабильность
Не вскрытый контроль CanChek Tumor Marker стабилен при температуре 2–8°C до истечения срока годности, указанного на этикетке флаконов. После разведения все аналиты стабильны в течение двух недель при хранении в тщательно закрытых флаконах при 2–8°C или 3 месяца при –20°C или ниже.

Замечание: После растворения антиген HCE не стабилен при -20°C.

Приготовление реагентов
Внесите точно 0.75 мл дистиллированной воды в каждый флакон. Закройте флакон и оставьте на 15 минут, периодически аккуратно вращая. Аккуратно переверните флаконы несколько раз перед использованием для достижения гомогенности раствора.

Предупреждения и меры предосторожности
Только для диагностики *in vitro*.
• Только для профессионального использования.
• Пожалуйста, соблюдайте правила безопасности при работе в медицинской лаборатории, опубликованные Министерством здравоохранения и социального обеспечения США (Бетесда, штат Мэриленд, США), № (CDC) 88-8395 или другие локальные или национальные правила биобезопасности.
• Следуйте региональным руководствам по утилизации отходов.

Внимание!
Каждая донорская сыворотка, использованная для приготовления реагентов с материалами человеческого происхождения, была протестирована с отрицательными результатами на наличие антител к HIV-1/2, HCV и поверхностного антигена гепатита B (HBsAg). Но, так как не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие инфекций, со всеми материалами необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными препаратами.

Допустимые значения
Диапазон допустимых значений, указанный на этикетке каждого флакона, был получен при многократном анализе контрольной сыворотки с помощью наборов CanAg EIA и действителен только для данного лота контроля CanChek Tumor Marker. Так как не существует международных контрольных материалов для HCE, S100B или SCC, то диапазон допустимых значений устанавливается по набору внутренних контрольных стандартов, имеющихся у производителя.

Ограничения
Контроли CanChek Tumor Marker не должны быть использованы в качестве стандартов.

FUJIREBIO® Diagnostics, Inc.

CanAg ® is a registered trademark of Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль Tumor Marker

Кат. N 108-20

IVD

Инструкция по применению. Версия 02.2014

Обозначения

LOT Номер лота

 Дата производства

 Использовать до

REF Номер по каталогу

 Производитель

IVD для диагностики In Vitro

 Температурный режим

 Обратитесь к инструкции по применению

 Биологическая опасность

CONT Компоненты набора

 Растворить в

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Назначение
Только для диагностики in vitro.
Fujirebio Diagnostics Контроль Tumor Marker (TMC) предназначен для проведения контроля качества лабораторных исследований при количественном определении аналитов, перечисленных в таблицах назначенных значений для конкретной партии.

Введение и принцип метода
Данный контроль может быть использованн в качестве объективной оценки лабораторных процедур и методов работы персонала.. Контроль качества исследований является неотъемлемой частью надлежащей лабораторной практики. Контрольные сыворотки двух уровней позволяют сопоставлять результаты с ожидаемыми диапазонами, таким образом обеспечивать соответствующие характеристики анализа на всем клинически значимом диапазоне. Данный контроль содержит обе формы ПСА: свободный ПСА и ПСА-АХТ в клинически значимых пропорциях (1, 2).

Реагенты
Уровень 1: 3 x 3 мл
Уровень 2: 3 x 3 мл
Данный продукт изготовлен из человеческой сыворотки, с добавлением очищенных биохимических материалов и химикатов. Контроль поставляется в лиофилизированной форме.

Хранение и стабильность

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Не вскрытые: Продукт стабилен при температуре 2–8°C до истечения срока годности, указанного на этикетке флаконов.
После растворения: После растворения **контроля** все аналиты стабильны в течение 14 дней при хранении в тщательно закрытых флаконах при 2–8°C, за исключением свободного ПСА, который при указанных условиях стабилен в течение 7 дней. Все аналиты стабильны в течение 60 дней при хранении при температуре ≤–20°C. Контроли могут быть заморожены/оттаяны до 9 раз. Не храните контроль при комнатной температуре.

Разведение
Используя калиброванную пипетку внесите точно 3.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Закройте флакон и оставьте при комнатной температуре 18–25°C приблизительно на 15 минут, периодически помешивая, для полного растворения. Аккуратно переверните флаконы несколько раз перед использованием, для получения равномерного раствора.

Процедура анализа
При проведении данного контроля точно следуйте всем инструкциям, прилагаемым к набору или анализатору. Контроль должен выполняться точно так же как и контроль пациента. Следуйте принятым локальным правилам по утилизации отходов. Материалы для контроля качества должны использоваться в соответствии с локальными, региональными и/или федеральными требованиями или другими требованиями официальных норм. В случае повреждения упаковки обращайтесь к вашему региональному дистрибьютору или к производителю, Fujirebio Diagnostics, контактная информация указана на последнем листе данной инструкции.

Меры предосторожности
Материалы человеческого происхождения. Обращайтесь как с потенциально инфекционно опасными материалами. Каждая донорская сыворотка, использованная для приготовления данного контроля, была протестирована методами, одобренными FDA, на содержание антител к HIV-1/2, HCV и *Treponema Pallidum* (сифилису) и содержание поверхностного антигена гепатита B (HBsAg), и были получены отрицательные результаты. Данные материалы могут содержать какие-либо другие человеческие патогены, для выявления которых не существует утвержденных методов выявления. Со всеми материалами человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными препаратами.
Никогда не пипетируйте ртом.
Во избежание перекрестной контаминации, убедитесь, что крышки и пробки флаконов не менялись во время использования.

Ограничения
1. Не используйте набор после окончания срока годности.
2. Выбросьте содержимое флаконов, если видны признаки микробного заражения или раствор контроля мутный.
3. Не используйте контрольные материалы в качестве стандартов.

Оценка значений
Допустимые диапазоны указанные в сертификате контроля качества, получены в результате многократного тестирования и специфичны по отношению к лоту. Указанные тестирования были выполнены производителем реагентов и/или в независимых лабораториях с помощью реагентов соответствующих производителей (доступных в момент выполнения тестирования) и с использованием контролей данного лота. Значения, получаемые в вашей лаборатории должны попадать в указанный диапазон допустимых значений; однако результаты, получаемые в лаборатории с течение срока годности контролей, могут отличаться от указанных значений. Вариации между лабораториями и в течение времени могут быть вызваны различиями в технике выполнения анализа, инструментах и реагентах, или изменениями в методе, описанном производителем. Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон допустимых значений и средние величины, а указанные диапазоны использовать только как ориентировочные.

Типичные значения
Значения, приведенные в таблице типичных значений на стр. 3, являются только примером типичных значений. Актуальные значения указаны в паспорте контрольных материалов, поставляемом с каждым набором, специфичном для каждого лота.
*Значения были получены при выполнении тестирования на анализаторе Abbott ARCHITECT и AxSYM, за исключением HE4 (Fujirebio Diagnostics EIA).
** Значения выше чем получаемые методом Abbott ARCHITECT.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Данные материалы представляют собой лиофилизированный продукт, изготовленный с очень строгим соблюдением стандартов контроля качества. Данные контроли необходимо хранить и использовать так, как указано в данной инструкции, для получения ожидаемых значений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lilja H, Ulmert D, and Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer : prediction, detection and monitoring. Nature Reviews Cancer 2008 ; 8: 268-278.
2. Catalona WJ, et al., Use of the Percentage of Free Prostate-Specific Antigen to Enhance Differentiation of Prostate Cancer From Benign Prostatic Disease. JAMA 1998 ; 279: 1542-1547.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Аналит	Диапазон типичных значений Уровень 1	Диапазон типичных значений Уровень 2	Единицы измерения анализа	Единицы СИ
АФП	15.4–28.6	193–344	нг/мл	мкг/л
CA15-3	11.9–22.1	105–195	ЕД/мл	кЕД/л
CA19-9	39.2–72.8	431–800**	ЕД/мл	кЕД/л
CA125	17.5–32.5	280–520	ЕД/мл	кЕД/л
РЭА	3.5–6.5	42.0–78.0	нг/мл	мкг/л
HE4	50.0–100.0	450–850	рМ	Пмоль/л
ФЕРРИТИН	31.5–75.0	280–520	нг/мл	мкг/л
СВОБОДНЫЙ ПСА	> 1.0	7.0–19.0	нг/мл	мкг/л
ПСА	2.3–4.2	21.0–39.0	нг/мл	мкг/л

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль Lung Marker

Исключительно в информационных целях
При выполнении анализа обратитесь к листку-вкладышу, прилагаемому к настоящему набору

Кат. N 240-20

IVD CE

Инструкция по применению. Версия 08.2020

Ознакомьтесь с выделенными изменениями

Обозначения

LOT Номер лота

Дата производства

Использовать до

REF Номер по каталогу

Производитель

IVD Только для диагностики In Vitro

Температурный режим

Обратитесь к инструкции по применению

Биологическая опасность

CONT Компоненты набора

Растворить в

Rx Only Использовать только врачом или по его предписанию

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкции на иных языках доступны для скачивания на сайте компании, www.fdi.com/ifu. Убедитесь, что вы скачиваете актуальную инструкцию, соответствующую лоту набора. Для этого выберете версию на нужном вам языке с той же датой выпуска, какая указана на первой странице инструкции, поставляемой с набором. Пожалуйста, тщательно следуйте указаниям, приведенным в инструкции. Инструкция по технике безопасности приведена в разделе WARNINGS AND PRECAUTIONS (ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ). Паспорт безопасности изделия (MSDS) доступен для скачивания на сайте компании www.fdi.com. Если у вас нет доступа в интернет, обратитесь к вашему региональному дистрибьютору, или в компанию Fujirebio Diagnostics AB за помощью.

Контроль Lung Marker

Инструкция по применению

Назначение

Только для диагностики in vitro.
Fujirebio Diagnostics Контроль Lung Marker предназначен для проведения контроля качества лабораторных исследований при проведении анализов CYFRA, SCC и ProGRP на системе LUMIPULSE *G*.

Введение и принцип метода

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Данный продукт контроля качества может быть использован в качестве объективной оценки лабораторных процедур и методов работы персонала. Контроль качества исследований является неотъемлемой частью надлежащей лабораторной практики. Контроль двух уровней позволяет сопоставлять результаты с ожидаемыми диапазонами, таким образом обеспечивать соответствующие характеристики анализа на всем клинически значимом диапазоне.

Реагенты
Уровень 1: 2 x 3 мл
Уровень 2: 2 x 3 мл
Данный продукт изготовлен из человеческой сыворотки, с добавлением очищенных биохимических материалов и химикатов. Контроль поставляется в лиофилизированной форме.

Хранение и стабильность
Не вскрытые: Продукты стабильны при температуре 2–8°C до истечения срока годности, указанного на этикетке флаконов.
После растворения: После растворения контроля продукт остается стабильным в течение 7 дней при хранении в тщательно закрытых флаконах при 2–8°C. Продукт стабилен в течение 31 дня при хранении при температуре ≤–20°C. Контроли могут быть заморожены/оттаяны до трех раз. Не храните контроль при комнатной температуре.
На борту: Продукт стабилен в течение 3 часов при хранении внутри системы LUMIPULSE G при условии, что в пробирку для образца добавлено не менее 250 мкл контроля. Меньшие объемы могут привести к ложно высоким концентрациям CYFRA, SCC и ProGRP из-за испарения.

Разведение
Используя калиброванную пипетку внесите точно 3.0 мл дистиллированной или деионизированной воды в каждый флакон. Закройте флакон и оставьте при комнатной температуре 18–25°C приблизительно на 15 минут, периодически помешивая, для полного растворения. Не переворачивайте флакон для перемешивания. Перед отбором проб допустимо использование вортекса в течение не более 3 секунд для получения равномерного раствора.

Процедура анализа
При работе с контролем следуйте всем инструкциям, предоставляемым с системой LUMIPULSE G. Контроль должен выполняться так же, как если бы вы использовали образец пациента. Следуйте принятым локальным правилам по утилизации отходов. Материалы для контроля качества должны использоваться в соответствии с локальными, региональными и/или федеральными требованиями или другими требованиями официальных норм. В случае повреждения упаковки обращайтесь к вашему региональному дистрибьютору или к производителю, Fujirebio Diagnostics, контактная информация указана на последнем листе данной инструкции.

Меры предосторожности
Только для диагностики in vitro
Rx only

Материалы человеческого происхождения. Обращайтесь как с потенциально инфекционно опасными материалами. Каждая донорская сыворотка, использованная для приготовления данных контрольных материалов, была протестирована на содержание антител к HIV-1/2, HCV и *Treponema Pallidum* (сифилису) и содержание поверхностного антигена гепатита B (HBsAg), и были получены отрицательные результаты. Данный продукт может содержать какие-либо другие человеческие патогены, для выявления которых не существует утвержденных методов выявления. Со всеми материалами человеческого происхождения необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными препаратами.
Никогда не пипетируйте ртом.
Во избежание перекрестной контаминации, убедитесь, что крышки и пробки флаконов не менялись во время использования.

Ограничения
1. Не используйте набор после окончания срока годности.
2. Выбросьте содержимое флаконов, если видны признаки микробного заражения или раствор контроля мутный.
3. Не используйте контрольные материалы в качестве стандартов.
4. Антиген SCC присутствует в коже, поте и слюне, а также легко попадает в аэрозоли (например, в результате чихания). Чтобы избежать ложных повышенных значений из-за контаминации, на протяжении всей процедуры тестирования, при работе флаконами с контролями, наконечниками пипеток и чашками для образцов следует использовать перчатки.

Оценка значений
Допустимые диапазоны концентрации CYFRA, SCC и ProGRP, указанные в сертификате контроля качества, получены в результате многократного тестирования с использованием Lumipulse G CYFRA, Lumipulse G SCC и Lumipulse G ProGRP и специфичны по отношению к лоту.
Определение значения контроля маркера рака легких были выполнены производителем реагентов и/или в независимых лабораториях с помощью реагентов соответствующих производителей (доступных в момент выполнения тестирования) и с использованием контролей данного лота. Значения, получаемые в вашей лаборатории должны попадать в указанный диапазон допустимых значений; однако результаты, получаемые в лаборатории с течение срока годности контролей, могут отличаться от указанных значений. Вариации между лабораториями и в течение времени могут быть вызваны различиями в технике выполнения анализа, инструментах и реагентах. Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон допустимых значений и средние величины, а указанные диапазоны использовать только как ориентировочные.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

FUJIREBIO®
Diagnostics, Inc.

Lumipulse is a registered trademark of FUJIREBIO INC. in Japan and in other countries.

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 58 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com

Lung Marker Control Prod. No. 240-20, 2020-08, F6109, r3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru