

Інструкція з використання

ІФА на хромогранін А

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

**TM E-9000**

ІФА на хромогранін А

Зміст

1.	Вступ	4
1.1	Призначення та принцип тесту	4
1.2	Клінічне застосування	4
2.	Процедурні застереження, рекомендації, попередження та обмеження	4
2.1	Процедурні застереження, рекомендації та попередження	4
2.2	Обмеження	5
2.2.1	Заважають речовини	6
2.2.2	Вплив ліків	6
2.2.3	Ефект Хука	6
3.	Зберігання та стабільність	6
4.	Матеріали	6
4.1	Вміст набору	6
4.2	Стандарти та контролі	7
4.3	Необхідні додаткові матеріали, але не входять до набору	7
4.4	Потрібне додаткове обладнання, яке не входить в набір	7
5.	Збір і зберігання зразків	7
6.	Процедура тестування	7
6.1	Приготування реагентів та подальші примітки	8
6.2	Підготовка зразків – Розведення	8
6.3	ІФА на хромогранін А	8
7.	Підрахунок результатів	9
7.1	Очікуване референтне значення	9
7.2	Типова стандартна крива	9
8.	Контроль якості	9
9.	Характеристики аналізу	10
9.1	Дані про продуктивність	10
9.2	Метрологічна простежуваність	10
10.	Посилання/Література	11
11.	Зміни	11

1. Вступ

1.1 Призначення та принцип тесту

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення хромограніну А в сироватці крові. Визначення хромограніну А допомагає у виявленні нейроендокринних пухлин і використовується для оцінки курсу лікування раку.

Кількісне визначення хромограніну А (CgA) здійснюється за основними принципами імуноферментного аналізу.

По-перше, хромогранін А у зразках, контролях і стандартах зв'язується з специфічними для CgA тілами мурашок, закріпленими на 96-лунковому планшеті для мікротитрування. Після інкубації та після етапів промивання формується сендвіч шляхом додавання антитіл CgA, кон'югованих з пероксидазою хрому. Після інкубації лунки ретельно промивають і комплекс, зв'язаний з твердою фазою, визначають за допомогою ТМВ як субстрату. Реакцію контролюють при 450 нм.

За допомогою стандартної кривої визначають концентрації CgA в зразках. Рекомендується ручна обробка. Використання автоматичного лабораторного обладнання є обов'язком користувача. Цей IVD призначений лише для професійного використання.

1.2 Клінічне застосування

Хромогранін А (CgA) — це кислий глікопротеїн із 439 амінокислотами, який присутній у секреторних щільних ядрах більшості нейроендокринних клітин [1]. Сімейство хромограніну складається щонайменше з трьох різних водорозчинних кислих глікопротеїнів (CgA, CgB і секретогранін II, який іноді називають хромогранін С) [1].

При стимуляції вивільняються CgA та інші пептидні гормони та нейропептиди. CgA також секретується з нейроендокринних пухлин [1].

Нейроендокринні пухлини (НЕП), які походять із нейроендокринних клітин, широко поширені по всьому організму [2]. Найпоширенішими місцями НЕТ є легені, шлунок, червоподібний відросток, сліпа кишка, дванадцятипала кишка, підшлункова залоза, тонка/клубова кишка, товста і пряма кишка [3]. НЕП, що виникають із шлунково-кишкового тракту, відомі як гастроентеропанкреатичні нейроендокринні пухлини (GEP-NET) і становлять приблизно 2/3 випадків NET [3]. Річна захворюваність НЕТ оцінюється як 2–5 випадків на 100 000 населення [2].

CgA широко експресується в нейроендокринній системі і служить загальним біомаркером для широкого спектру нейроендокринних пухлин [3]. Визначення хромограніну А допомагає у виявленні нейроендокринних пухлин і використовується для оцінки курсу лікування раку [3–6].

2. Процедурні застереження, рекомендації, попередження та обмеження

2.1 Процедурні застереження, рекомендації та попередження

- (1) Цей набір призначений лише для професійного використання. Користувачі повинні добре розуміти цей протокол для успішного використання цього набору. Тільки інструкція з тестування, що надається в наборі, є дійсною і має використовуватися для проведення аналізу. Надійна робота може бути досягнута лише при суворому та ретельному дотриманні наданих інструкцій.
- (2) Цей аналіз був перевірений для певного типу зразка, як зазначено в Призначеному використанні (будь ласка, зверніться до глави 1). Відповідальність за будь-яке використання цього набору не за призначенням є користувачем, і виробник не несе відповідальності.
- (3) Необхідно дотримуватися принципів належної лабораторної практики (НЛП).
- (4) Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, надягайте лабораторні халати, одноразові захисні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.
- (5) Якщо у зв'язку з цим продуктом виникнуть серйозні інциденти, про них слід повідомити виробника та компетентні національні органи.
- (6) Усі реагенти та зразки набору слід довести до кімнатної температури та обережно, але ретельно перемішати перед використанням. Для розведення або відновлення використовуйте деіонізовану, дистильовану або надчисту воду. Уникайте повторного заморожування та розморожування реагентів та зразків.

- (7) Мікропланшет містить відривні стріпи. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2–8°C в герметичному пакеті з фольги з осушувачем і використовується в наданій рамці. Стріпи мікропланшета, які виймаються з рамки для використання, повинні бути промарковані відповідним чином, щоб уникнути будь-якого переплутування.
- (8) Настійно рекомендується повторне визначення зразка.
- (9) Після того, як тест було розпочато, усі кроки слід виконати без перерв. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої підготовлені до використання у відповідний час.
- (10) Час інкубації впливає на результати. Усі лунки слід обробляти в однаковому порядку та в однакових проміжках часу.
- (11) Щоб уникнути перехресного забруднення реагентів, використовуйте нові одноразові наконечники для піпеток для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту та контролю.
- (12) Для кожного запуску необхідно створити стандартну криву.
- (13) Контролі повинні бути включені в кожен запуск і відповідати встановленим межах довіри. Межі довіри перераховані у звіті QC, який надається разом із набором.
- (14) Не змішуйте компоненти набору з різними номерами партій у межах тесту та не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, як зазначено на етикетках набору.
- (15) Уникайте контакту зі стоп-розчином, що містить 0,25 MН₂ТОМУ₄. Це може викликати подразнення шкіри та опіки. У разі потрапляння в очі або шкіру негайно промити водою.
- (16) Субстрат ТМБ має подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки. У разі можливого контакту промийте очі великою кількістю води, а шкіру – водою з милом.
- (17) Щоб отримати інформацію про небезпечні речовини, що входять до набору, зверніться до Листу даних безпеки (SDS). Паспорт безпеки для цього продукту доступний безпосередньо на веб-сайті виробника або за запитом.
- (18) Реагенти набору слід розглядати як небезпечні відходи та утилізувати відповідно до національних правил.
- (19) Очікувані еталонні значення, зазначені в цій інструкції з тестування, є лише орієнтовними. Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні референтні інтервали.
- (20) У разі серйозних пошкоджень тестового набору або компонентів виробника необхідно повідомити в письмовій формі не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не можна використовувати для пробного запуску. Їх необхідно правильно зберігати, поки виробник не вирішить, що з ними робити. Якщо буде вирішено, що вони більше не придатні для вимірювань, їх необхідно утилізувати відповідно до національних правил.
- (21) Реагенти цього набору, які містять сироватку або плазму людини, були протестовані та підтверджені негативними на ВІЛ I/II, HBsAg та HCV згідно затверджених процедур. Однак усі реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку під час використання та утилізації.
- (22) Результати, отримані за допомогою цього тест-набору, не повинні розглядатися як єдина причина будь-яких терапевтичних наслідків, але їх слід співвідносити з іншими діагностичними тестами та клінічними спостереженнями.

2.2 Обмеження

Будь-яке неналежне використання зразків або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

У трохи більше ніж 10 % зразків, використаних для порівняння методу, було виявлено розбіжність між вимірюваннями Kryptor II та ELISA. Це були зразки, концентрація СgА яких була в межах 350–900 мкг/л.

Для можливих перехресних реакцій перевіряли кількість використаних специфічних антитіл. Навіть якщо не вдалося виявити значущих перехресних реактивностей, не можна виключити, що у рідкісних окремих випадках і залежно від ліків або статусу захворювання може мати місце вплив на значення.

Якщо визначення хромограніну А використовується як частина спостереження за пацієнтом, ми рекомендуємо наступну процедуру:

- Пробу пацієнта слід завжди досліджувати одним і тим же методом під час його лікування.
- У разі відхилень під час спостереження слід з'ясувати, чи відбулися зміни в прийомі ліків або способі життя.

Якщо у вас виникли додаткові запитання, зверніться до виробника.

2.2.1 Впливаючі речовини

Зразки сироватки, що містять преципітати або нитки фібрину, можуть призвести до неточних результатів. Біотин (до 1200 нг/мл), гемолітичні проби (до 1 мг/мл гемоглобіну), жовтяні проби (до 50 мг/дл білірубину) та ліпемічні проби (до 1700 мг/дл тригліцеридів) не впливають на результати аналізу. Якщо виникають сумніви, рекомендується не використовувати в аналізі гемолітичні, жовтяничні та ліпемічні зразки.

2.2.2 Вплив ліків

Такі ліки, як інгібітори протонної помпи, селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну та антагоністи рецепторів гістаміну типу 2, можуть впливати на рівень СgА в сироватці.

2.2.3 Ефект Хука високої дози


У цьому тесті не спостерігалось Хук - ефекту .

3. Зберігання та стабільність

Зберігайте набір і реагенти при 2–8°C до закінчення терміну придатності. Не використовуйте компоненти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору. Після відкриття реагенти стабільні протягом 2 місяців при зберіганні при 2–8 °С. Після відкриття пакета, що закривається, слід подбати про те, щоб знову щільно закрити його разом із осушувачем.

4. Матеріали

4.1 Вміст набору

ВА E-0030	WASH-CONC 50x	Промивний буферний концентрат – Концентрований 50 x, фіолетовий ковпачок
Зміст:	Буфер з неіонним миючим засобом і фізіологічним рН	
Обсяг:	1 x 20 мл/флакон	
ТМ E-9010	КОН'ЮГАТ	Кон'югат антитіл – Готовий до використання, червоний ковпачок
Зміст:	Антитіла до хромограніну А кролика, кон'юговані з пероксидазою	
Обсяг:	1 x 6 мл/флакон	
Опис:	Вид – кролик	
ВА E-0055	СУБСТРАТ	Субстрат – Готовий до використання, чорний ковпачок
Зміст:	Хромогенний субстрат, що містить 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, субстратний буфер і перекис водню дійсний	
Обсяг:	1 x 12 мл/ви	
ВА E-0080	СТОП -SOLN	Стоп розчин – Готовий до використання, світло-сірий ковпачок
Зміст:	0,25 М сірчаної кислоти	
Обсяг:	1 x 12 мл/флакон	
Небезпеки ідентифікація:		H290 Може бути корозійним для металів.
ТМ E-9031	Ш 96	Мікропланшет хромограніну А – Готовий до використання
Зміст:	1 x 96-лунковий (12x8) мікропланшет із попереднім покриттям антитілами в пакеті, що повторно закривається з осушувачем	
Опис:	Вид – кролик	

TM E-9013	ASSAY BUF	Буфер для аналізу – Готовий до використання, синій ковпачок
Зміст:	Буфер з білками та консервантами без ртуті 1 x 50	
Обсяг:	мл/флакон	
Опис:	Видом білка в буфері є бичачий	

4.2 Стандарти та контролю

Стандарти та контролю – готові до використання

кат. номер	Компонент	Колір/ковп.	Концентрація [мкг/л]	CgA	Обсяг/Флакон
TM E-9001	СТАНДАРТ А	білий	0		1 мл
TM E-9002	СТАНДАРТ Б	світло-жовтий	30		1 мл
TM E-9003	СТАНДАРТ В	помаранчеви			
TM E-9004	СТАНДАРТ С	й	110		1 мл
TM E-9005	СТАНДАРТ Д	темно-синій	450		1 мл
TM E-9051	СТАНДАРТ Е	світло-сірий	900		1 мл
TM E-9052	КОНТРОЛЬ 1	світло-зелений		Зверніться до Звіту про контроль якості	1 мл
Зміст:	КОНТРОЛЬ 2	темно-червоний		очікувана вартість і прийнятний діапазон.	1 мл

Буфер для аналізу з певною кількістю людського хромограніну А та стабілізуючим білком

Опис: Хромогранін А отримують з людини, стабілізуючий білок – з великої рогатої худоби походження

4.3 Необхідні додаткові матеріали, але не входять до набору

- Абсорбуючий матеріал (паперовий рушник)
- Вода (дейонізована, дистильована або надчиста)

4.4 Необхідне додаткове обладнання, яке не входить у набір

- Відкалібровані точні піпетки для дозування об'ємів від 20 до 400 мкл
- Пристрій для промивання мікропланшетів (ручний, напівавтоматичний або автоматизований)
- ІФА-рідер, здатний зчитувати поглинання при 450 нм і, якщо можливо, 620–650 нм
- Шейкер для мікропланшетів (амплітуда струшування 3 мм; при бл. 600 об/хв)
- Вихровий змішувач

5. Збір і зберігання зразків

Сироватка

Зібрати кров за допомогою венепункції (Monovette або Vacuette), дати їй згортатися та відокремити сироватку центрифугуванням відповідно до інструкцій виробника. Не центрифугувати до повного згортання. Пацієнтам, які отримують антикоагулянтну терапію, може знадобитися збільшення часу згортання крові.

При проведенні дослідження рекомендується не використовувати гемолітичні, жовтяничні та ліпемічні зразки (див. 2.2.1). Якщо зразки не використовуються негайно для аналізу, їх необхідно зберігати замороженими.

Зберігання: тривалий термін (до 6 місяців) при -20 °С.

Слід уникати повторного заморожування та розморожування.

6. Процедура тестування

Дайте всім реагентам і зразкам нагрітися до кімнатної температури і ретельно перемішати шляхом обережного перевертання перед використанням. Рекомендується робити визначення в двох примірниках. Пронумеруйте мікропланшети (стріпи мікропланшета, які виймаються з рамки для використання, повинні бути промарковані відповідним чином, щоб уникнути переплутування).

Зв'язування антисироватки та ферментного кон'югату та активність ферменту залежать від температури. Чим вище температура, тим вищими будуть значення поглинання. Різний час інкубації матиме подібний вплив на поглинання. Оптимальна температура під час імуноферментного аналізу становить 20–25 °С.



Обов'язковим є використання шейкера для мікротитраційних планшетів з такими характеристиками: амплітуда струшування 3 мм; прибл. 600 об/хв. Струшування з різними налаштуваннями може вплинути на результати.

6.1 Приготування реагентів та додаткові примітки Буфер для промивання

Розведіть 20 мл концентрату промивного буфера **WASH-CONC50X** водою до кінцевого об'єму 1000 мл. Зберігання: 2 місяці при 2–8 °С

Мікротитраційні стріпи хромограніну А

У рідкісних випадках залишки блокуючого та стабілізуючого реагенту можна побачити в лунках у вигляді маленьких білих крапок або ліній. Ці залишки не впливають на якість продукту.

6.2 Підготовка зразків – Розведення

Перед використанням зразки сироватки необхідно розбавити 1+20 з буфером аналізу, наприклад, 20 мкл зразка сироватки + 400 мкл буфера аналізу.

Зразки сироватки, які були виявлені за межами кривої, також слід відповідно розбавити з буфером аналізу і повторно проаналізувати.

6.3 ІФА на хромогранін А

1. Внесіть піпеткою 50 мкл стандартів, контролю та розведених зразків у лунки мікропланшета хромограніну А. і витримуйте 1 год при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (прибл. 600 об/хв).
2. Видаліть або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 4 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, видаливши вміст і щоразу промокніть насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
3. Піпеткою введіть 50 мкл **КОН'ЮГАТУ** в кожен лунку та інкубуйте 1 год при КТ (20–25 °С) на шейкері (прибл. 600 об/хв).
4. Видаліть або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 4 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, видаливши вміст і щоразу промокніть насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
5. Піпеткою введіть 100 мкл **СУБСТРАТУ** в кожен лунку.
6. Інкубуйте протягом 25 ± 5 хв при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (прибл. 600 об/хв). Уникайте впливу прямих сонячних променів!
7. Додайте 100 мкл **СТОП-розчину** кожен лунку і струсіть мікропланшет, щоб забезпечити однорідний розподіл розчину.
8. **Прочитайте** поглинання розчину в лунках протягом 10 хв за допомогою мікропланшета, встановленого на 450 нм (за наявності рекомендована еталонна довжина хвилі від 620 нм до 650 нм).

7. Підрахунок результатів

Діапазон вимірювання	Хромогранін А в сироватці
	2,3–900 мкг/л

Стандартну криву отримують шляхом побудови графіка показників поглинання (розрахунку середнього поглинання) стандартів (лінійних, по осі у) проти відповідних стандартних концентрацій (логарифмічних, по осі х) із використанням концентрації 0,001 мкг/л для стандарту А (це вирівнювання є обов'язковим через логарифмічне представлення даних).

Використовуйте нелінійну регресію для підгонки кривої (наприклад, 4-параметр, marquardt).

Концентрації зразків і контролів можна зчитувати безпосередньо зі стандартної кривої.

Зразки, виявлені з концентраціями, вищими за найвищий стандарт (Стандарт Е), слід відповідно розбавити буфером аналізу і потрібно пройти повторний аналіз.

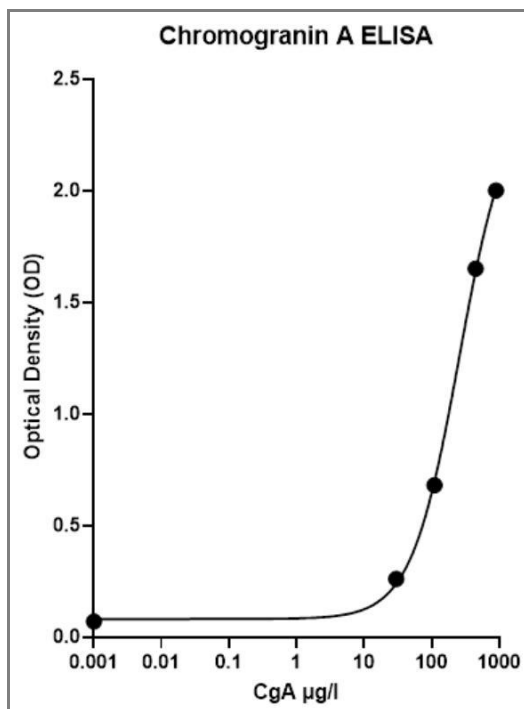
7.1 Очікуване довідкове значення

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала власні референтні значення.

	Хромогранін А в ромі
Довідкове значення (ULN) [7]	<100 мкг/л
Типовий патологічний діапазон [7]	До 143500 мкг/л

7.2 Типова стандартна крива

Наприклад, не використовувати для розрахунку!



8. Контроль якості

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до національних правил. Використовуйте засоби контролю як на нормальному, так і на патологічному рівнях. З контрольними зразками, отриманими в комерційних цілях, слід поводитися як із невідомими зразками. Контрольні зразки повинні входити у встановлені межі довіри. Межі достовірності контролів набору надруковані у звіті QC.

9. Характеристики аналізу

9.1 Дані про продуктивність

Точність					
В аналізі			Між аналізами		
n = 12			n = 10		
Зразок	Середнє ± СВ [мкг/л]	РЕЗЮМЕ [%]	Зразок	Середнє ± СВ [мкг/л]	CV [%]
1	43,6 ± 1,2	2.8	1	73,0 ± 3,8	5.2
2	73,5 ± 3,0	4.2	2	102 ± 3,5	3.5
3	103 ± 3,4	3.3	3	161 ± 5,7	3.6
4	161 ± 10,1	6.3	4	300 ± 16,0	5.3
5	283 ± 14,6	5.1			
6	502 ± 15,9	3.2			

Аналітична чутливість	
Ліміт бланк (LOB)	0,9 мкг/л
Межа виявлення (LOD)	1,4 мкг/л
Межа кількісної оцінки (LOQ)	2,3 мкг/л

Відновлення		Діапазон [мкг/л]	Середнє [%]	Діапазон [%]
	Хромогранін А		43,6–502	101

Лінійність		Послідовне розведення до	Середнє [%]	Діапазон [%]
	Хромогранін А		1:64	92

Порівняння методів: BRANMS CgA II Kryptor	CgA ІФА = 1,05 x (Криптор) - 15; $R^2 = 0,97$; n = 57
--	--

Лот до Лота	Хромогранін А в сироватці (n = 4)	Зразок	Діапазон [нг/мл] середнє ± SD	CV [%]
		1	42,5 ± 2,5	6
		2	111 ± 3,2	3
		3	500 ± 20,9	4

Діагностична Продуктивність [7] GEP-NET	Діагностична Специфічність [%]	Діагностична Чутливість [%]	Позитивний Прогнозне значення (PPV) [%]	Негативний Прогнозне значення (NPV) [%]
	83	56	87	49
	Коефіцієнт позитивної правдоподібності (LR+)		Коефіцієнт негативної правдоподібності (LR-)	
	3.3		0,53	

9.2 Метрологічна простежуваність

Значення, присвоєні стандартам і контролям ІФА на хромогранін А, простежуються за референтним методом BRAHMS CgA II Kryptor.

Стандарти та контролю	Невизначеність [%]
	7.5

ІФА на хромогранін А

Розширена невизначеність [%] $k=2^*$

16.5

* Це визначає інтервал щодо результату вимірювання, який включатиме справжнє значення з імовірністю 95%

10. Посилання/Література

1. O'Toole, D., et al., ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: біохімічні маркери. *Нейроендокринологія*, 2009. 90(2): с. 194-202.
2. Verbeek, WH, CM Korse, and ME Tesselaa, GEP-NETs ОНОВЛЕННЯ: Секреція шлунково-ентеропанкреатичні нейроендокринні пухлини та біомаркери. *Eur J Endocrinol*, 2016. 174(1): с. R1-7.
3. Singh, S. and C. Law, Chromogranin A: чутливий біомаркер для виявлення та моніторингу після лікування гастроентеропанкреатичних нейроендокринних пухлин. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. 6(3): с. 313-34.
4. Лаутан О. Хромогранін а у фізіології та онкології. *Фоліа Біол (Прага)*, 2011. 57(5): с. 173-81
5. Yang, X., et al., Діагностичне значення циркулюючого хромограніну а для нейроендокринних пухлин: а систематичний огляд і мета-аналіз. *PLoS One*, 2015. 10(4): с. e0124884.
6. Корті, А., Ф. Маркуччі та Т. Бачетті, Циркулюючий хромогранін А та його фрагменти як діагностичні та прогностичні маркери захворювання. *Pflugers Arch*, 2018. 470(1): с. 199-210.
7. van Treijen, MJC, та ін., Профілювання транскриптів крові для виявлення нейроендокринних пухлин: результати великого незалежного перевірконого дослідження. *Front Endocrinol (Лозанна)*, 2018. 9: с. 740.

Щоб отримати оновлену літературу або іншу інформацію, зверніться до місцевого постачальника.

11. Зміни

Версія	Дата випуску	Розділ	Змінити
18.0	09.07.2021	всі	-Перегляд аналізу через зміну партії використана відповідна пара антитіл -IFU було переглянуто відповідно до IVDR регламент (ЄС) 2017/746 -Розведення зразка змінено з 1+8 до 1+20 (Розділ 6.2) -Додано типовий патологічний діапазон (Розділ 7.1) -Змінені характеристики аналізу (Розділ 9.1) - між лотами і діагностична продуктивність була додана характеристики аналізу -Додано метрологічну простежуваність (Розділ 9.2) -Посилання/література оновлено (розділ 10)

Символи:

	Зберігання температура		Виробник		Містить достатню кількість для <n> тестів
	Термін придатності	LOT	Лот	IVD	Для in vitro тільки для діагностики!
	Проконсультуй теся інструкції для використання	CONT	Зміст	CE	маркуванням CE
	Обережно	REF	Каталожний номер		