

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от « » 20 г. №

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«25» октября 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОГО АНТИГЕНА СА 19-9
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ОнкоИФА-СА 19-9»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-СА 19-9» предназначен для количественного определения ракового антигена СА 19-9 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Раковый антиген СА 19-9 относится к группе муциноподобных гликопротеинов, т.н. Sialyl Lewis Antigens (SLA). Повышенная концентрация СА 19-9 часто наблюдается у пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта, в частности, карциномами поджелудочной железы, прямой кишки, желудка и печени. Повышение концентрации СА 19-9, наряду с повышением концентрации РЭА, позволяет предположить патологию желчного пузыря. Обнаружение этого опухолеспецифичного антигена может также быть связано с некоторыми другими новообразованиями.

Определение концентрации СА 19-9 в сыворотке крови может быть использовано при мониторинге пациентов, у которых диагностированы вышеперечисленные опухоли.

С клинической точки зрения значение концентрации СА 19-9 само по себе не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами.

Повышенную концентрацию СА 19-9 в сыворотке крови отмечают у 1% нормальных здоровых женщин, у 3% женщин с незлокачественными патологиями яичников и у 6% пациентов с различными незлокачественными состояниями (в том числе во время первого триместра беременности, менструации, при эндометриозе, фиброзе матки, остром сальпингите, заболеваниях печени, воспалительных процессах брюшины и перикарда).

1.3. Набор «ОнкоИФА-СА 19-9» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ОнкоИФА-СА 19-9» использован двухстадийный «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа (Рисунок 1). На первой стадии анализа в лунки, покрытые стрептавидином, вносятся калибровочные пробы с известным содержанием СА 19-9, контрольная сыворотка и анализируемые образцы. Затем добавляется конъюгат моноклональных антител к СА 19-9 с биотином (на Рисунке 1: МАТ1-биотин). В результате реакции между моноклональными антителами и молекулой СА 19-9 образуется комплекс, который связывается со стрептавидином, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит разделение свободных и связанных антителами белков сыворотки крови.

На второй стадии в лунки добавляются конъюгированные с пероксидазой антитела, специфичные к другому эпитопу молекулы СА 19-9 (на Рисунке 1: МАТ2-пероксидаза). Меченное ферментом антитело связывается с молекулами СА 19-9, которые были иммобилизованы во время первой инкубации. Несвязавшийся конъюгат удаляется промывкой. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации СА 19-9 в исследуемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА 19-9 в исследуемых образцах.

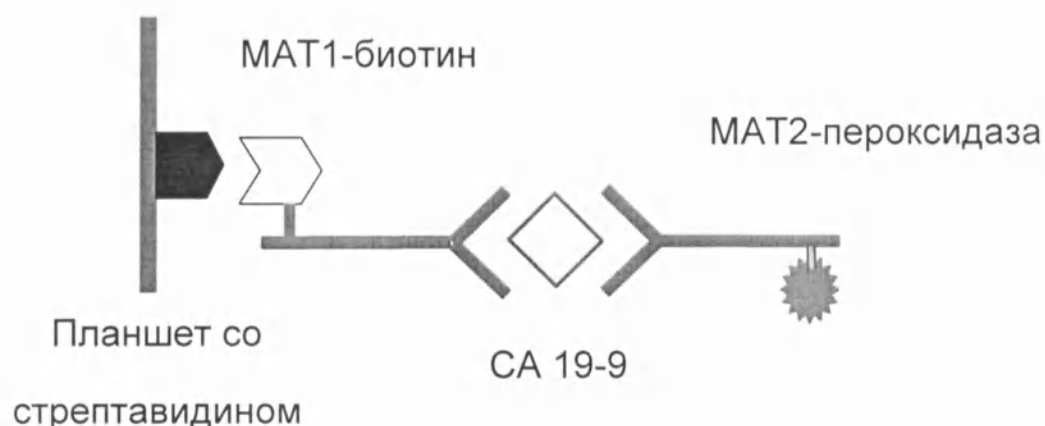


Рисунок 1. Схема анализа

2.2 Состав набора

— комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином» - 1 упаковка;

— калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества СА 19-9. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций СА 19-9 в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 10; 50; 100; 250; 500 Ед/мл – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 1,0 мл);

— конъюгат, содержащий моноклональные антитела к СА 19-9 с биотином, маркирован «Конъюгат Е №1» – 1 флакон (13 мл);

— конъюгат, содержащий моноклональные антитела к СА 19-9 с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е №2» – 1 флакон (13 мл);

— концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер М» – 1 флакон (20 мл);

- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием СА 19-9, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (20,0 мл). **Поставляется отдельно.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к СА 19-9 с другими анализатами и интерференция приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Вещество	Исследованная концентрация	Перекрестная реакция
СА 19-9	-	100%
СА 125	10 000 Ед/мл	0,1%
СА 15-3	1 000 Ед/мл	Не определяется
ПСА	5 000 нг/мл	Не определяется
АФП	10 000 нг/мл	Не определяется
РЭА	10 000 нг/мл	Не определяется
ХГч	10 000 мМЕ/мл	Не определяется
Ревматоидный фактор	1000 кМЕ/мл	Не определяется

3.2. Коэффициент вариации результатов определения СА 19-9 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ОнкоИФА-СА 19-9» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 19-9 в исследуемых образцах при разведении их буфером Д (поставляется по запросу клиента) имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%

3.4. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 19-9 в сыворотке крови человека не превышает 1,0 Ед/мл.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» СА 19-9 — проверка соответствия значения определяемой концентрации СА 19-9 расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях анализата зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ОнкоИФА-СА 19-9» хук-эффект не наблюдается.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. У большинства здоровых людей концентрация СА 19-9 ≤ 40 Ед/мл.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 1.
- 4.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.3.** При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 620 нм (референтная длина волны). Применение длины волны 620 нм не является обязательным, но предпочтительнее, поскольку позволяет обнаружить интерференцию пластика;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

– цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–500 мл;

– стакан стеклянный подходящего объема;

– вода дистиллированная;

– бумага фильтровальная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

– контейнер для дезинфекции;

– ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой внести по 1 мл дистиллированной воды, во флакон с контрольной сывороткой – 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат Е №1, конъюгат Е №2 готовы к использованию. Расход конъюгатов на один стрип составляет по 1,08 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз. Например:

5 мл буфера М + 245 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор ТМБ готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 0,75 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

7.1.8. Разведение исследуемых образцов сыворотки крови. Если концентрация СА 19-9 в образце по предварительным данным или по результатам анализа (см. п. 9.3.) выше КП №6, образец следует развести в 10 и более раз буфером Д (дополнительно поставляется по запросу клиента). При разведении необходимо тщательное перемешивание.

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 – для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 – для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 – для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 – для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 – для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 – для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 – для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 – для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в дубликатах по 25 мкл калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов в соответствующие лунки.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.3. Внести во все лунки, кроме A1 и A2, по 100 мкл конъюгата Е №1.

***Примечание:** Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну открытой стрептавидином лунки.*

7.2.4. Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20-30 секунд.

7.2.5. Инкубировать стрипы в темноте в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без шейкирования.

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода). Промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.7.1.6., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.7. Внести во все лунки, кроме A1 и A2, по 100 мкл конъюгата E №2.

7.2.8. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) 60 минут без шейкирования.

7.2.9. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок путем декантирования или аспирации и промыть лунки согласно п.7.2.6.

7.2.10. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

7.2.11. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15-30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.12. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 15-20 секунд.

7.2.13. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.12., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

***Примечание:** максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

Если оптическая плотность калибровочной пробы №6 превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

***Примечание:** среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации СА 19-9 (Ед/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

***Примечание 1:** при применении референтной длины волны 620 нм оптическую плотность каждой калибровочной пробы, полученную при 620 нм, вычитают из оптической плотности, полученной при 450 нм, эти значения используют для построения калибровочного графика.*

Примечание 2: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 3: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой (1):

$$B - B_T \quad (1)$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание СА 19-9 в пробах по калибровочному графику. В случае разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА 19-9 умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации СА 19-9, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации СА 19-9 в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.8.

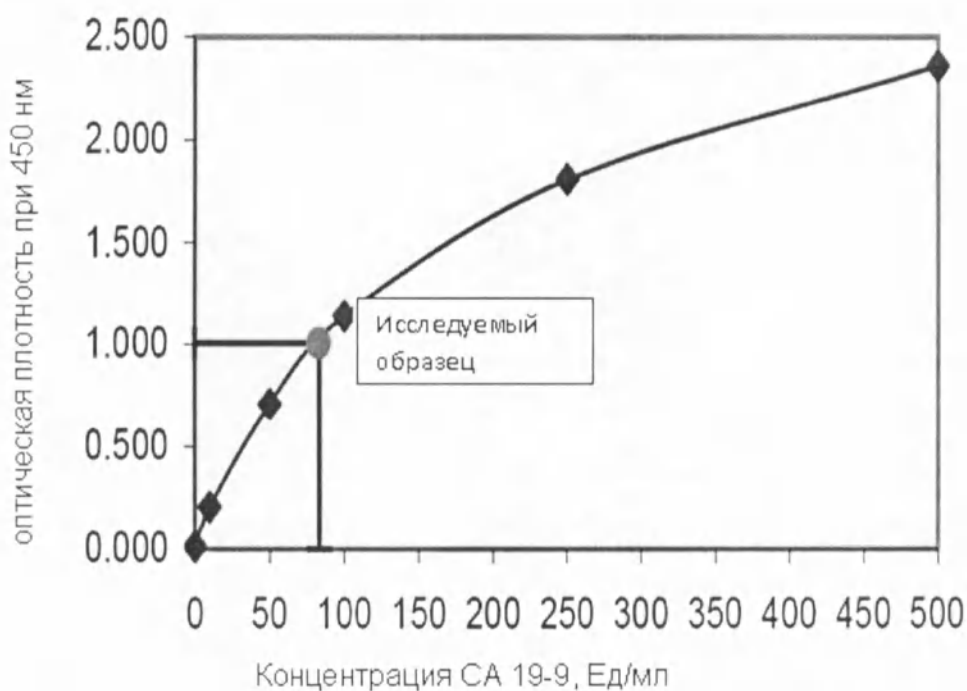


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-СА 19-9» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анали-

за, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

- стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, конъюгат Е №1, конъюгат Е №2 и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- буфер М и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации СА 19-9 в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгатов, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать их в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Примечания к приложению 1: КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура ($+18...25^{\circ}\text{C}$);

ПО — программное обеспечение.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА - СА 19-9» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГБОУ ДПО
РМАПО Минздравсоцразвития России

д.м.н., профессор Долгов В.В.
« 06 » января 2011г.

