



В.Ю. Борисов

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
**«Тест-система иммуноферментная для количественного определения СА19-9
в сыворотке крови человека»**
"ИФА-СА19-9"

Регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7104 от 28.04.2018 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для количественного определения СА19-9 в сыворотке крови человека» «ИФА-СА19-9» предназначен для количественного определения СА-19-9 в сыворотке крови человека с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

Для однократного применения набора по назначению.

Для клинической лабораторной диагностики in vitro.

Показания и противопоказания к применению изделия

Изделие предназначено для обследования больных при диагностике различных видов опухолей ЖКТ, печени, яичников, операбельности опухоли и исследовании эффективности терапии.

Противопоказаний не существует.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Углеводный антиген СА19-9 известен также как сиалированный антиген Льюиса (сиалил Льюис^А): модифицированный остатком сиаловой кислоты антиген групп крови системы Льюиса. Он представляет собой тетрасахарид, который в организме может быть связан с разнообразными гликопротеинами и гликолипидами, в том числе с муцинами и ганглиозидами.

В норме показатель на СА 19-9 должен составлять от 0 до 37 ЕД/мл и для мужчин, и для женщин. Если концентрация белка будет равна 0 ЕД/мл или антиген вообще отсутствует в крови, то патологических процессов в организме нет. Если по результатам исследования на онкомаркер СА 19-9 наблюдается повышенный показатель, то это может указывать на развитие доброкачественных заболеваний: Воспалительные процессы в кишечнике: панкреатит Холангит муковисцидоз, непроходимость желчевыводящих путей. Повышение маркера во многих случаях связывают с патологическими процессами, происходящими в печени или желчном пузыре. Именно в этих органах происходит метаболизм данного белка. При нарушении функции печени, застое желчи утилизация онкомаркера снижается. Незначительные отклонения в работе данных органов отражаются на уровне СА 19-9 в крови.

Повышение концентрации СА19-9 на мембранах клеток слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и в биологических жидкостях ассоциируется с аденокарциномами различных отделов ЖКТ и холоангиокарциномой. Значительное усиление синтеза СА19-9 связано с особенностями развития опухоли и играет существенную роль в ее прогрессировании, в частности, в процессе образования метастаз.

Количественное измерение уровня СА19-9 в сыворотке крови традиционно используется для исследования различных видов опухолей эпителия ЖКТ, в первую очередь, карциномы поджелудочной железы. Также определение СА19-9 применяется в лабораторных исследованиях бронхоальвеолярной аденокарциномы или аденокарциномы яичников. СА19-9 наиболее эффективен, как прогностический маркер, в частности, при определении операбельности опухоли, а также при составлении прогноза после операции и исследовании эффективности терапии.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	Моноклональные антитела к СА19-9, адсорбированные в лунках стрипов 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций с плоским дном	12 стрипов
<i>допускается раздельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>		
Калибровочные пробы (КП1-6)	Пробы, содержащие известную концентрацию СА19-9 (ориентировочные значения концентрации СА19-9 в КП1 – 0 МЕ/мл, в КП2 – 25 МЕ/мл; в КП3 – 75 МЕ/мл; в КП4 – 150 МЕ/мл; в КП5 – 300 МЕ/мл; в КП6 – 600 МЕ/мл; точные значения концентраций указываются на этикетках флаконов для каждой серии набора); прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	№ 1 – 1,0 мл в 1 фл. № 2 – 0,4 мл в 1 фл. № 3 – 0,4 мл в 1 фл. № 4 – 0,4 мл в 1 фл. № 5 – 0,4 мл в 1 фл. № 6 – 0,4 мл в 1 фл.
Контрольный положительный образец (К+)	Проба, содержащая СА19-9 в известном диапазоне концентраций (указывается на этикетке флакона для каждой серии набора); прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость красного цвета.	0,4 мл в 1 фл.
Конъюгат	Моноклональные антитела к СА19-9, меченные пероксидазой хрена; прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость синего цвета, возможно наличие осадка.	15 мл в 1 фл.
40-кратный концентрат отмывающего буферного раствора [ОР(х40)]	Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно наличие белого осадка.	25 мл в 1 фл.
Раствор индикаторный (РИ)	Субстратный раствор, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода; прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл в 1 фл.
Стоп-реагент	Прозрачная бесцветная жидкость.	15 мл в 1 фл.
Одноразовые наконечники для автоматических пипеток		(16 шт.)
Клейкая пленка для планшетов		(4 шт.).

Примечания. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

Набор укомплектован принадлежностями:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению и бланк калибровочного графика.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации позволяет одномоментное дублированное исследование 48 образцов, включая калибровочные и контрольные (на каждый образец используется 2 лунки, при этом на калибровочные и контрольные образцы используется 14 лунок). Предусмотрена возможность проведения раздельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	2	4	6	8	10	12
Число иссл. обр.	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется «сэндвич» вариант ИФА с двумя видами моноклональных антител, полученных к разным эпитопам СА19-9. Моноклональные антитела к одному из эпитопов антигена нанесены на поверхность лунок иммуносорбента, антитела к другому эпитопу связаны с ферментом (пероксидазой) и входят в состав конъюгата. При внесении в лунки иммуносорбента исследуемого

образца сыворотки и конъюгата происходит образование комплекса /антитело иммуносорбента/-/СА19-9/-антитело конъюгата/. Наличие этого комплекса выявляется по цветной реакции с ТМБ. Интенсивность окрашивания реакционной смеси пропорциональна концентрации СА19-9 в образце.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка крови человека объемом не менее 20 мкл.

Образцы до исследования можно хранить не более 3 сут при температуре от 2 до 8°C и 3 мес при температуре минус 20°C или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать. Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов или с признаками гемолиза, и с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом центрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

Сбор биологического материала должен производиться в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований».

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность (минимальная определяемая концентрация СА19-9) – не более 1 МЕ/мл.

Коэффициент вариации <8 %.

Процент открытия составляет 90-110%.

Зависимость ОП от концентрации СА19-9 сохраняет линейный характер в диапазоне от 0 до 600 МЕ/мл; отклонение от линейности в указанном диапазоне составляет менее 10%.

"Hook-эффект" (обратно пропорциональная зависимость ОП от концентрации аналита, возникающая при высоких его концентрациях) не наблюдается до концентрации 8000 МЕ/мл.

Коэффициент регрессии:

для серии 01 от 08.2017 г. составил 0,9348;

для серии 02 от 08.2017г. составил 0,9334.

Коэффициент корреляции составил 0,939963.

Воспроизводимость результатов составила 100%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.).

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

Набор реагентов, в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» относится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы).

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин,

Термостат на 37 °С.

Холодильник бытовой.

Фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

Контейнер для сбора жидких отходов.

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

ИФА-анализатор.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Приготовление рабочего промывочного раствора

При выпадении осадка солей в ОР(х40) прогреть его при температуре 37°С до полного растворения осадка.

При постановке на полном планшете с использованием ИФА-анализаторов 25мл ОР(х40) довести очищенной водой до 1 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ОР(х40) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1.

Число стрипов	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ОР(х40), мл	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	25
Вода очищенная, мл	до 160	до 240	до 320	до 400	до 480	до 560	до 640	до 720	до 800	до 880	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 190 сут, при температуре от 18 до 25 °С – не более 15 суток.

Примечание: Все реагенты, кроме отмывающего раствора, готовы к применению. Конъюгат перед использованием тщательно перемешать в течение двух-трех минут!

Проведение ИФА ("ручная" постановка)

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть унаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25°С (пакет с иммуносорбентом выдерживать при указанной температуре до вскрытия!). Жидкие реагенты тщательно перемешать. Извлечь из пакета планшет, вскрыв выше замка «zip-lock», и установить на рамку необходимое для проведения ИФА количество стрипов. Неиспользованные стрипы немедленно поместить обратно в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть «zip-lock» и поместить в холодильник.

Исследуемые образцы, в которых ранее была определена концентрация СА19-9 более 600 МЕ/мл, предварительно развести в КП1 (концентрация СА19-9 должна попадать в диапазон от 25 МЕ/мл до 600 МЕ/мл).

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

Таблица 2. Рекомендуемая схема внесения образцов при использовании 12 стрипов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КП1	КП1	ИО2	ИО2	ИО10	ИО10	ИО18	ИО18	ИО26	ИО26	ИО34	ИО34
B	КП2	КП2	ИО3	ИО3	ИО11	ИО11	ИО19	ИО19	ИО27	ИО27	ИО35	ИО35
C	КП3	КП3	ИО4	ИО4	ИО12	ИО12	ИО20	ИО20	ИО28	ИО28	ИО36	ИО36
D	КП4	КП4	ИО5	ИО5	ИО13	ИО13	ИО21	ИО21	ИО29	ИО29	ИО37	ИО37
E	КП5	КП5	ИО6	ИО6	ИО14	ИО14	ИО22	ИО22	ИО30	ИО30	ИО38	ИО38
F	КП6	КП6	ИО7	ИО7	ИО15	ИО15	ИО23	ИО23	ИО31	ИО31	ИО39	ИО39
G	K+	K+	ИО8	ИО8	ИО16	ИО16	ИО24	ИО24	ИО32	ИО32	ИО40	ИО40
H	ИО1	ИО1	ИО9	ИО9	ИО17	ИО17	ИО25	ИО25	ИО33	ИО33	ИО41	ИО41

1. Внести в лунки планшета (как можно ближе ко дну каждой лунки) по 10 мкл контрольных проб и исследуемых образцов в соответствии со схемой их внесения.

2. Добавить в каждую лунку по 100 мкл конъюгата.

Внимание! Максимальная воспроизводимость результатов обеспечивается соблюдением одного и того же порядка внесения реагентов. Общее время внесения образцов и конъюгата не должно превышать 15 мин. В противном случае калибраторы следует вносить в отведенные для них лунки после пипетирования первой полосины проб. Если для анализа используется больше одного планшета, калибровку следует выполнять для каждого планшета.

3. Инкубировать планшет в термостатируемом шейкере при температуре 37° С и вращении со скоростью 500 об/мин в течение 60 минут.

4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер для сбора жидких отходов и промыть лунки 5 раз отмывающим буферным раствором, заполняя лунки до краев и выдерживая их каждый раз по 30 с. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

5. Внести во все лунки по 100 мкл РИ и выдержать стрипы 15 - 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25°С.

6. Добавить по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, соблюдая последовательность и скорость внесения в них РИ и не более чем через 15 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность измерять при длине волны 450 нм, а выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществлять по воздуху.

Результаты ИФА учитывать при следующих условиях:

ОП_{450нм} КП6 – более 0,500

ОП_{450нм} КП1 – менее 0,100.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Построить калибровочную кривую методом кусочно-линейной интерполяции по точкам, ординатами которых являются полученные в ИФА значения ОП КП, а абсциссами – концентрации СА19-9 в этих пробах, указанные на этикетках флаконов, и определить по данной кривой концентрации СА19-9 в К+ и исследованных образцах (для разведенных образцов полученную по графику концентрацию СА19-9 необходимо умножить на степень разведения образца).

При использовании для расчетов концентраций СА19-9 компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать подходящий метод аппроксимации (четырёх- или пятифакторные регрессионные модели с преобразованиями осей и др.).

Полученные значения концентраций СА19-9 в исследуемых образцах учитывать только при условии попадания полученного значения концентрации СА19-9 в К+ в диапазон концентраций, указанный на этикетке флакона.

Интерпретация результатов

Содержание СА19-9 в сыворотке крови здорового взрослого человека не превышает 37 МЕ/мл.

Примечание. Каждой лаборатории следует самостоятельно определить нормальную концентрацию СА19-9 с учетом используемого оборудования, способа взятия крови и методики анализа.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 18 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение наборов должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес.

Транспортирование

Транспортирование наборов – при температуре от 2 до 8°С транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25°С в течение 15 суток.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для количественного определения СА19-9 в сыворотке крови человека» «ИФА-СА19-9», соответствует ТУ 9398-243-70423725-2016, Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности.

По вопросам, касающимся качества набора "ИФА-СА-125", следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1-1а, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК.

При предъявлении рекламации по поводу несоответствия физических и специфических характеристик набора реагентов заявленным для проведения объективного расследования производителем причин несоответствия потребитель должен предоставить:

1. набор реагентов той серии, на которую предъявляется рекламация;
2. все спорные исследуемые образцы пациентов;
3. протоколы анализа с указанием наименования, серии и сроков годности использованного набора реагентов.

протоколы исследования с использованием других методов/наборов реагентов с указанием серии, сроков годности, производителя примененных наборов реагентов.

Директор ЗАО "ЭКОлаб" по научной работе

С.Г. Марданлы

"СОГЛАСОВАНО"

Генеральный директор ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

«19»

2020 г.



П.К. Варнавичус

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА
("ИФА- СА19-9")**

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в соответствии со схемой постановки по 10 мкл КП1-6, К+, исследуемых образцов
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	1 ч, при 37°C и 500 об/мин
Промыть	5 раз отмывающим буферным раствором
Внести	по 100 мкл РИ в каждую лунку
Инкубация	15-20 мин, при 18-25°C в защищенном от света месте
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм)



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

лист 06

Ген. Директор ЗАО "ЭКОлаб"
Борисов В.Ю.
"10" 10 2020 г.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 7 ЛИСТОВ



20120 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.