



НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ СА 19-9 В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ

Методика от 11-2011
Версия 3.0

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Намеченное Использование

TM-CA19.9 DRG ELISA является ферментным иммунологическим анализом для количественного измерения *in vitro* СА 19-9 в сыворотке и плазме.

1.2 Общая информация и объяснение

Слюножелезистый эпителий Льюиса также известен под названием раковый антиген СА 19-9.

Уровень СА 19-9 часто увеличиваются в сыворотке пациентов с раком панкреато-желчной системы (то есть поджелудочная железа, желчный пузырь, желчный тракт). Кроме того, повышенные уровни СА 19-9 наблюдались при других злокачественных развитиях, таких как рак лёгкого, другой желудочно-кишечный рак и в некоторых доброкачественных нарушениях.

Это должно быть взято в акунт, что пациенты, генотипикалли отрицательный для антигена группы крови Льюиса, будут неспособны произвести СА 19-9 антигенов даже в присутствии злокачественной ткани.

2 ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

TM-CA19.9 DRG ELISA – это набор твердофазного иммуносорбентного анализа с меченным ферментом (ЭЛИСА), основанный на принципе сэндвича.

Лунки покрыты моноклональными [мышь] антителами, направленными к уникальному антигенному участку молекулы СА 19-9. Определенное количество образца пациента, содержащее эндогенный СА 19-9, икубируется в покрытой лунке с буфером.

После шага промывки следует вторая инкубация с ферментным конъюгатом, который представляет собой Анти-СА 19-9 антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат удаляется промывкой.

Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации СА 19-9 в образце.

После добавления раствор субстрата интенсивность развитого цвета пропорциональна концентрации СА 19-9 в образце пациента.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Этот набор предназначен только для использования *in vitro* диагностике. Только для профессионального использования.
2. Все реактивы этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, были проверены и подтверждены отрицательными для ВИЧ I/II, HBsAg и ВГС по одобренным FDA методам. Все реактивы, однако, должны расцениваться как потенциальные биологически опасные при использовании и для утилизации.
3. Прежде, чем начать анализ, полностью и внимательно прочитайте инструкции. Используйте действительную версию инструкции, предоставленной в наборе. Убедитесь, что все понятно.
4. Микропланшет содержит отламываемые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2°C – 8°C в изолированном мешочке из фольги и использоваться в поставляемом держателе.
5. Пипетирование образцов и реактивов должно быть сделано как можно быстрее и в одинаковой последовательности для каждого шага.
6. Используйте емкости только для одних реактивов. Это особенно относится к емкостям субстрата. Используя емкость для того, чтобы распределить раствор субстрата, который ранее использовался для раствора конъюгата, может окрасить раствор. Не переливайте реактивы назад во флаконы, поскольку может произойти загрязнение реактива.

7. Смешивайте содержимое лунок микроплашки полностью, чтобы гарантировать хорошие результаты анализа. Не используйте микролунки после анализа.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавляйте реактивы немедленно после завершения шагов промывки.
9. Позвольте реактивам достигнуть комнатной температуры (21-26°C) прежде, чем начать анализ. Температура повредит считыванию абсорбции. Однако это не повлияет на значения образцов.
10. Никогда не пипетируйте ртом, избегайте контакта реактивов с кожей и слизистыми.
11. Не курите, не ешьте, не пейте и не накладывайте косметику в местах проведения анализа при работе с реактивами набора.
12. Надевайте одноразовые латексные перчатки при обращении с образцами и реактивами. Микробное загрязнение реактивов или образцов может дать ложные результаты.
13. Обращение с набором должно осуществляться в соответствии с процедурами, определенными соответствующей национальной инструкцией по технике безопасности при работе с биологически опасными объектами, или другими нормативными актами.
14. Не используйте реактивы после даты окончания срока годности, указано на этикетках набора.
15. Все указанные объемы должны быть выполнены согласно протоколу. Оптимальные результаты анализа достигаются только если использовать калиброванные пипетки и ридер.
16. Не смешивайте и не используйте компоненты от наборов различных серий. Рекомендуется не менять лунки разных плашек, даже той же самой серии. Наборы, возможно, были отправлены или хранились при различных условиях, и поэтому характеристики плашек могут слегка отличаться.
17. Избегайте контакта с *Стоп-Раствором*, содержащим 0,5M H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
18. Некоторые реактивы содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ как консерванты. В случае контакта глазами или кожей, немедленно промойте водой.
19. Субстрат ТМБ имеет раздражающий эффект на кожу и слизистую оболочку. В случае возможного контакта, промойте глаза достаточным объемом воды, а кожу – мылом и обилием воды. Промойте загрязненные объекты прежде, чем снова использовать их. При вдохе, доставьте пострадавшего человека на открытую площадку.
20. Химические вещества, а также готовые к использованию реактивы должны расцениваться как опасные отходы в соответствии с национальной инструкцией по технике безопасности при работе с биологически опасными объектами и другими нормативными актами.
21. Для поиска информации относительно опасных веществ, включенных в набор, пожалуйста, обратитесь к Сертификату Безопасности. Сертификат для этого продукта доступен по запросу непосредственно от DRG.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Реактивы в наборе

- Микролунки**, 12×8 стрипов (отдельно отмываемые), 96 лунок; Лунки покрыты Анти-СА 19-9 антителами (моноклональными).
- Нулевой Стандарт**, 1 пузырек, 3 мл, готов к использованию. Содержит нертутный консервант.
- Стандарт (Стандарт 1-5)**, 5 пузырьков, 0,5 мл, готовы к использованию;
Концентрации: 15 – 30 – 60 – 120 – 240 Е/мл
Содержит нертутный консервант.
- Контроль Низкий & Высокий**, 2 пузырька, (лиофилизированные), 0,5 мл каждый;
см. „Подготовка Реактива“
Значения и диапазоны контроля, пожалуйста, смотрите на этикетке пузырька или в Листе Контроля Качества. Содержит нертутный консервант.
- Рабочий Буфер Анализа**, 1 пузырек, 7 мл, готов к использованию. Содержит нертутный консервант.
- Ферментный Конъюгат**, 1 пузырек, 14 мл, готовы к использованию,
Анти-СА 19-9 антитела, конъюгированные к пероксидазе хрена;
Содержит нертутный консервант.
- Раствор Субстрата**, 1 пузырек, 14 мл, готовы к использованию,
Тетраметилбензидин (ТМБ).
- Стоп-Раствор**, 1 пузырек, 14 мл, готовы к использованию, содержит 0,5M H₂SO₄.
Избегайте контакта со стоп-раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
- Раствор Промывки**, 1 пузырек, 30 мл (40× концентрат), см. „Подготовку Реактивов“.

Внимание: Дополнительный *Нулевой Стандарт* для разбавления образцов доступен по запросу.

4.2 Требуемые материалы, не поставляемые в наборе

- Микропланшетный ридер (450 ± 10 нм)
- Калиброванные микропипетки переменной точности.
- Гигроскопичная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Таймер
- Полулогарифмическая миллиметровка или программное обеспечение для сжатия данных

4.3 Условия Хранения

При условии хранения 2 – 8 °С не вскрытые реактивы сохраняют реактивность до истечения срока годности. Не используйте реактивы после этой даты.

Открытые реактивы должны храниться при 2 – 8 °С. Микролунки должны храниться 2 – 8 °С. Как только мешок фольги был открыт, необходимо снова его прочно закрыть. Открытые наборы сохраняют активность в течение двух месяцев при условиях, описанных выше.

4.4 Подготовка Реактивов

Перед использованием доведите все реактивы и требуемое количество стрипов до комнатной температуры.

Контроли

Восстановите лиофилизированное содержимое 0,5 мл дистиллированной воды и дайте постоять в течение 10 минут минимум. Смешайте контроль несколько раз перед использованием.

Внимание: ресуспендированный контроль должен быть распределен и сохранен при –20°С.

Раствор Промывки

Добавьте деионизированную воду к 40× концентрату Раствор Промывки.

Разбавьте 30 мл концентрированного Раствора Промывки дистиллированной водой на 1170 мл до заключительного объема 1200 мл.

Разбавленный Раствор Промывки стабилен в течение 2 недель при комнатной температуре.

4.5 Утилизация Набора

Утилизация набора должна быть проведена согласно национальным инструкциям. Специальная информация для этого продукта дана в Сертификате Безопасности.

4.6 Поврежденные Наборы

В случае любого тяжелого повреждения набора или компонентов, нужно сообщить об этом в ДРГ в письменной форме не позднее, чем спустя одну неделю после получения набора. Сильно поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны быть сохранены, пока не будет найдено окончательное решение. После этого они должны быть утилизированы согласно официальным инструкциям.

5 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном анализе могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТА- или гепарин-плазма).

Не используйте гемолизные, желтушные или жирные образцы. Пожалуйста, обратите внимание: Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в данном анализе.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венипункцией (например, Сарштедт Моноветт # 02.1388.001), позвольте ей стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания. Образцы пациентов, получающих терапию противосвертывающего средства, могут потребовать большего времени свертывания крови.

Плазма:

Целая кровь должна быть собрана в пробирки для центрифуги, содержащие антикоагулянт, и центрифугироваться немедленно после отбора.

(Например, для ЭДТА-плазмы Сарштедт Моноветт – красный колпачек - # 02.166.001;

для Гепарина-плазмы Сарштедт Моноветт – оранжевый колпачек - # 02.165.001;

5.2 Хранение и Подготовка Образцов

Образцы должны быть закрыты и могут храниться до анализа в течение 5 дней при 2 – 8 °С.

Если ЭДТА-плазма хранится при 2 – 8 °С, она должна быть проанализирована в течение 48 часов.

Образцы, не востребованные в течение более длительного времени (до двух месяцев), должны быть заморожены только один раз при –20 °С до анализа. Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз до анализирования.

5.3 Разбавление Образцов

Если при первом анализе образец содержит аналита больше, чем самый высокий стандарт, его можно разбавить *Нулевым Стандартом* и повторно проанализировать, как описано в Процедура Анализа.

Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

Пример:

а) разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (смешиваются полностью),

б) разбавление 1:100: 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (смешиваются полностью).

6 ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Общие Замечания

- Всем реактивам и анализам нужно позволить дойти до комнатной температуры перед использованием. Все реактивы должны быть смешаны без вспенивания.
- Как только анализ был начат, все шаги должны быть закончены без прерывания.
- Используйте новые одноразовые наконечники пипеток для каждого стандарта, контроля или образца, чтобы избежать контаминации.
- Абсорбция - функция времени инкубации и температуры. Прежде, чем начать анализ, рекомендуется, чтобы все реактивы были готовы, удаленные колпачки, все необходимые лунки закреплены в держателе, и т.д. Это обеспечит равное затраченное время для каждого шага раскапывания без прерывания.

- Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2. Процедура Исследования

- Каждая постановка должна включать в себя калибровочную кривую.

1. Обеспечьте желательное количество лунок в держателе.
2. Внесите 50 мкл каждого Стандарта, Контроля и Образцов одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
3. Внесите 50 мкл Буфера Анализа в каждую лунку.
4. Инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре.
5. Резко встряхните содержание лунок.

Промойте лунки 4 раза разбавленным Раствором Промывки (400 мкл/лунку). Резко выстучите лунки на гигроскопичной бумаге, чтобы удалить остаточные капли.

Важное примечание:

Чувствительность и точность данного анализа сильно зависят от правильной процедуры промывки!

6. Внесите 100 мкл Ферментного конъюгата в каждую лунку.
7. Инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре.
8. Резко встряхните содержание лунок. Промойте лунки 4 раза разбавленным Раствором Промывки (400 мкл/лунку). Резко выстучите лунки на гигроскопичной бумаге, чтобы удалить остаточные капли.
9. Добавьте 100 мкл Раствора Субстрата в каждую лунку.
10. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре.
11. Остановите ферментативную реакцию, добавляя 100 мкл Стоп-раствора в каждую лунку.
12. Определите абсорбцию (ОП) каждой лунки при 450 ± 10 нм микропланшетным ридером. Рекомендуется, чтобы лунки были считаны в течение 10 минут после добавления Стоп-раствора.

6.3. Вычисление Результатов

1. Вычислите средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.
2. Используя полулогарифмическую миллиметровку, создайте стандартную кривую, изображая среднюю абсорбцию, полученную из каждого стандарта против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрации на горизонтали (X) оси.
3. Используя среднее значение абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию от калибровочной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты, показанные в данной инструкции, были вычислены автоматически с использованием 4 ПЛ (4-хПараметровой Логистики) кривой. 4-хПараметровая Логистика является предпочтительным методом. Другие функции обработки данных могут дать немного различные результаты.
5. Концентрация образцов может читаться непосредственно по этой калибровочной кривой. Образцы с концентрациями выше, чем у самого высокого стандарта, должны быть разбавлены и проанализированы заново либо представлены как > 240 Е/мл. Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

6.3.1. Пример Типичной Калибровочной Кривой

Следующие данные предназначены только для демонстрации и **не могут** использоваться для реального анализа.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Стандарт 0 (0 Е/мл)	0,04
Стандартный 1 (15 Е/мл)	0,26
Стандартные 2 (30 Е/мл)	0,44
Стандартные 3 (60 Е/мл)	0,78
Стандартные 4 (120 Е/мл)	1,30
Стандартные 5 (240 Е/мл)	1,99

7 ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определила свои собственные нормальные и патологические значения.

Следующие значения наблюдаются в плазме при исследовании, проводимом с очевидно нормальными здоровыми взрослыми, используя TM-CA19.9 DRG ELISA:

Население	N	5% Перцентиль	95% Перцентиль
Мужчины	32	0,69	20,84
Женщины	39	1,3	13,38

Одни результаты сами по себе не должны быть единственной причиной для каких-либо терапевтических заключений. Результаты должны коррелировать с другими клиническими наблюдениями и диагностическими анализами.

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартные правила лабораторной практики требуют, чтобы контроль использовался при каждой калибровочной кривой. Статистически значительное количество контролей должно быть измерено, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, гарантирующие точную работу.

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственному регулированию и нормам федерального права. Использование контрольных образцов рекомендуется использовать повседневно для проверки подлинности результатов. Используйте контроли на нормальных и на патологических уровнях.

Контрольные значения и соответствующие результаты лаборатории ОТК заявлены в листе контроля качества (КК), вложенном в набор. Значения и диапазоны, обозначенные в листе КК, относятся всегда только к текущей партии (лоту) набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные или международные программы Оценки Качества, чтобы гарантировать точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для того, чтобы проанализировать значения контроля и тренды. Если результаты анализа не вписываются в указанные диапазоны контроля, результаты пациента должны считаться неверными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические аспекты: раскапывание из пипетки и измерительные устройства; фотометр, сроки годности реактивов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывки.

После проверки вышеупомянутых параметров, не находя ошибки, пожалуйста, свяжитесь с Вашим дистрибьютором или ДРГ непосредственно.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический Диапазон Анализа

Диапазон испытания между 0,2 – 240 Е/мл.

9.2 Специфичность Антител (Перекрестная реактивность)

Перекрестной реактивности в данном анализе не выявлено.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность ДРГ ИФА была вычислена, добавив 2 среднеквадратичных отклонения к средним из 20 репликатов обследования Нулевого Стандарта (S0), и составила 0,20 Е/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 В пределах анализа

Вариабельность внутри постановки показана ниже:

Образец	n	Средний (Е/мл)	КВ (%)
1	20	27,68	8,4
2	20	47,68	9,2
3	20	74,04	9,6

9.4.2 Между анализами

Межпостановочная вариабельность показана ниже:

Образец	n	Средний (Е/мл)	КВ (%)
1	6	6,02	8,1
2	6	10,42	1,9
3	6	14,98	8,7

9.5 Восстановление

Образцы были усилены добавлением растворов СА 19-9 с известными концентрациями в соотношении 1:1.

Процент восстановления был вычислен умножением отношения измерений и ожидаемых значений на 100 (ожидаемое значение = (эндогенный СА 19-9 + добавленный СА 19-9) / 2; из-за разбавления 1:2 сыворотки с усиленным материалом).

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Е/мл]	22,6	22,1	17,6
Среднее Восстановление	91,9	87,7	91,1
Диапазон Восстановления [%]	от	87,4	85,5
	до	95,9	91,6

9.6 Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Е/мл]	82,7	25,8	41,7
Среднее Восстановление	100,8	109,7	102,6
Диапазон Восстановления [%]	от	93,1	103,9
	до	108,5	114,7

10 ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены только тогда, когда процедура анализа будет выполнена с полным пониманием инструкции, вложенной в набор, а также когда будет привязка к стандарту GLP.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого анализа могут повлиять на результаты.

10.1 Мешающие Вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), Билирубин (до 0,125 мг/мл) и Триглицериды (до 30 мг/мл) не имеет никакого влияния на результаты анализа.

Проба содержит реактивы для минимизации вмешательства АМАЧ (антимышиных антител человека) и гетерофильных антитела. Однако, чрезвычайно высокие титры АМАЧ или гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

10.2 Лекарственное взаимодействие

До сих пор нам не известны никакие вещества (препараты), которые имеют влияние на измерение СА 19-9 в образце.

10.3 «Хук-Эффект» высокой дозы

«Хук-Эффект» не наблюдался в этом анализе до 3840,0 Е/мл СА 19-9.

11 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Надежность Результатов

Анализ должен быть выполнен полностью согласно инструкциям изготовителя для использования. Кроме того пользователь должен строго следовать правилам GLP (Хорошая Лабораторная Практика) или другим доступным национальным стандартам и/или законам. Это особенно важно для использования контрольных реактивов. Важно всегда включать в рамках анализа достаточное число контрольной для того, чтобы удостовериться в правильности и точности анализа.

Результаты испытаний действительны, только если все контрольные в пределах указанных диапазонов и если все другие параметры анализа также в пределах данных спецификаций анализа. В случае любого сомнения или беспокойства, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

11.2 Терапевтические Последствия

Терапевтические выводы никогда не должны быть основаны на одних только лабораторных результатах, даже если все результаты испытаний совпадают с вещами, указанными в п. 11.1. Любой лабораторный результат - только часть полной клинической картины пациента.

Только в случаях, когда лабораторные результаты находятся в приемлемом совпадении с полной клинической картиной пациента, делаются терапевтические выводы.

Сам результат испытаний никогда не должен быть единственным определяющим фактором для того, чтобы получить любые терапевтические выводы.

11.3 Ответственность

Любая модификация набора и/или замена, или смешивание любых компонентов различных партий от одного набора с другим могут отрицательно повлиять на результаты и валидацию всего анализа. Такая модификация и/или замена лишают законной силы любое рекламационное требование.

Рекламационные требования, попадающие под неверное истолкования клиентом лабораторных результатов, указанных в п. 11.2., также не принимаются. Тем не менее, в случае любого требования, ответственность изготовителя не должна превысить стоимость набора. Любой ущерб, нанесенный набору во время транспортировки, не относится к ответственности изготовителя.

ССЫЛКИ / ЛИТЕРАТУРА

(см. в оригинале инструкции)

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua