КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определенияантигена СА 19.9 в сыворотке (плазме) крови «СА 19.9-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «СА 19.9 - ИФ А» предназначен для количественного определения концентрации антигена СА 19.9 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. СА 19.9, или углеводный антиген сиалил-Льюиса, представляет собой антиген (эпитоп), ассоциированный с раком поджелудочной железы, печени, желудка, а также толстой и прямой кишки. Количественное определение СА 19.9 в сыворотке ил и плазме крови, особенно одновременно с определением карциноэмбрионального антигена (КЭА, ХЕМА кат. № К224). полезно для контроля эффективности лечения и слежения за течением рака указанной локализации. Вместе с тем выведение антигена из циркуляции зависит от проходимости желчных путей, поэтому холестаз может вызвать неадекватное повышение уровня антигена в сыворотке. Кроме того, у некоторых индивидов отсутствует фермент, синтезирующий данную детерминанту; поэтому ант иге н СА 19.9 у них не определяется, несмотря на наличие злокачественной опухоли. В связи с этим данные по содержанию СА 19 .9 всегда следует интерпретировать в комплексе с результатами других методов исследования и клиническими данными.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение уровня антигена СА 19.9 в сыворотке (плазме) крови используется для клинической лабораторной диагностики онкологических процессов различной этиологии.

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение антигена СА 19.9 основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к антигену СА 19.9. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации одновременно происходит связывание антигена СА 19.9, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к антигену СА 19.9 с пероксидазой.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание содержимого лунок. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена СА 19.9 в исследуемом образце. Концентрацию антигена СА 19.9 в

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

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью «ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (ОП 450) от содержания антигена СА 19.9 в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный с имобилизированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными анти-СА 19.9 антителами; готов к использованию - 1 шт.;

калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (pH 7,2-7,4), содержащие известные количества антигена СА 19.9- **О; 12; 60; 120 и 240 Е д/ мл;** содержание антигена СА19.9 в калибровочных пробах может несколько отличаться от указанных величин , точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (калибровочная проба 0 Ед / мл - 6 мл, остальные по 0,8 мл каждая);

конъюгат; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

ИФА-Буфер; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антигена СА 19.9 ; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);

концентрат отмывочного раствора 26- кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);

стоп-реагент ; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;

аналитический паспорт;

Инструкция по применению Набора.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Использование подобранной на испытательной базе ООО «ХЕМА» пары мышиных моноклональных антител к антигену СА 19.9 человека позволяет достичь высокой специфичности анализа.

Перекрестные реакции мышиных моноклональных антител к антигену СА 19.9 с другими аналитами приведены в **Таблице.**

Анали т	Перекрестная реакция, %
Карцино-эмбриональный антиген (КЭА)	< 0,1
Антиген СА 125	< 0,1
Антиген СА 15.3	< 0,1

3.2 . Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «СА 19.9-ИФА» концентрация антигена СА 19.9 в сыворотке (плазме) крови не превышает 2 Ед/мл.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания антигена СА 19.9 в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием

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

Набора реагентов «СА 19.9 -ИФ А» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» антигена СА 19.9 - соответствие измеренной концентрации антигена СА 19.9 пред писанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 60 Ед/мл.

Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации антигена СА 19.9 в образцах сыворотки(плаз мы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей антигена СА 19.9 , имеет линейный характер в диапазоне концентраций 12 -240 Ед/мл и составляет ± 10 ,0 %.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Нижний предел, Ед/мл	Верхний предел, Ед/мл
Здоровые доноры (мужчины и женщины)	-	35

В соответствии с требованиям и **GLP** *(Good Laboratory Practice,* Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «СА19.9-ИФА» уточнить значения концентрации антигена СА19.9, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение *«Правил устройства техники безопасности, производственной санитарии. противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидилогическихучреждений системы Министерства здравоохранения СССР»* (Москва, 1981 г.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- **фотометр вертикального сканирования,** позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450нм;
- **термостат,** поддерживающий температуру +37°С± 0,1°С;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости вдиапазоне 25,0-250 мкл;
- **цилиндрмерный** вместимостью 1 000 мл;
- **вода дистиллированная;**
- **перчатки** резиновые или пластиковые;
- **бумага** фильтровальная.

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки(плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+ 18 - 25°С) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 24 ч или при температуре минус 20 °с не более 2 недель.

6.3. Для про ведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «СА 19.9-ИФА» для про ведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется о пределе ние концентрации антигена СА 19.9 в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходи мое количество конце нтрата отмывочного раствора **и** развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор до пускается хранить при комнатной температуре (+ 18-25 °С) не более 15 суток или при температуре +2-8 °с не боле е 45 суток.

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация антигена СА 19.9 в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови превышает 240 Ед/мл, его следует предварительно развести, используя калибровочную пробу О Ед /мл.

7.2. Внести во все лунки планшета по 50 мкл ИФА-Буфера.

7.3. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. *В* остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-1О мин.

7.4. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движения ми по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при комнатной температуре +37 °с.

7.5 . По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 3 раза путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

7.7. Заклеить планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 минут при температуре 37 °с.

7.8. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора.

7.9. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18- 25 °С) в течение 10- 20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.10. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при дли не волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести не позднее 5 мин после внесения стоп-реагента.

В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре, планшет допускается хранить при температуре +2-8°с не более 4 ч.

8.2. Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках с калибровочной пробой Ед/мл из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину **В** - сред нее арифметическое значение величины ОП в лунках, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку или исследуемые образцы. Если же фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок с калибровочной пробой Ед/мл, то необходимо пользоваться формулой **В-$В_0$**, где $В_0$ - среднее арифметическое значение величины ОП в лунках с калибровочной пробой Ед/мл.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация антигена СА 19.9 в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450).

9.2. Определить по калибровочному графику содержание антигена СА 19.9 в исследуемых образцах.

9.3. Если исследуемы й образец сыворотки (плазмы) дополнительно разводили (см. п. 7.1.), умножить полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕПИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «СА 19.9- ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности (18 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °с не более 15 суток.

10.2. *Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.*

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

- ИФА-Буфер,конъюгат, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ),стоп-реагент после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 2 мес.; при

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 °с в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор до пускается хранить при комнатной температуре (+18- 25 °С) не более 15 сут. или при температуре +2-8 °с не более 45сут.;

- оставшийся неиспользованным концентрат-отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «СА 19.9-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» 110 адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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