

ВЕКТОР

БЕСТ

Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации СА 19-9
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

СА 19-9 – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
T-8470

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА 19-9 – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации СА 19-9 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. СА 19-9 представляет собой углеводный антиген, являющийся маркером рака поджелудочной железы, желудка, печени, а также толстой и прямой кишок. В сыворотке здоровых людей концентрация СА 19-9 составляет от 0 до 30 Ед/мл. У 45% больных раком поджелудочной железы концентрация в сыворотке крови СА 19-9 повышена. При доброкачественных заболеваниях поджелудочной железы концентрация СА 19-9 повышена у 12% больных, причем максимальный уровень не превышает 45 Ед/мл. Выведение антигена из циркуляции зависит от проходимости желчных путей, поэтому холестаз может вызвать неадекватное повышение уровня СА 19-9.

1.3. Количественное определение содержания СА 19-9 в сыворотке крови, особенно одновременно с определением раковоэмбрионального антигена (РЭА) полезно для контроля эффективности лечения и мониторинга рака поджелудочной железы, желудка, печени, кишечника.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и контрольного образца при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител к СА 19-9. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание антигена из сыворотки с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к СА 19-9 с пероксидазой связывается с антигеном СА 19-9, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации СА 19-9 в анализируемых пробах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочной графика рассчитывается концентрация СА 19-9 в анализируемых образцах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к СА 19-9, готовый для использования – 1 шт.;
- конъюгат антител к СА 19-9 с пероксидазой хрена, концентрат – 1 фл., 1,3 мл;

- калибровочные образцы, аттестованные относительно стандарта «Liphocheck Tumor Marker Control» (фирма BioRad, Франция), содержащие известные количества СА 19-9 - 0; 15; 30; 75; 150; 300 Ед/мл; концентрации СА 19-9 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; готовые для использования – 6 фл., по 0,7 мл;
- контрольный образец с известным содержанием СА 19-9, готовый для использования – 1 фл. 0,7 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 фл., 13 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшет – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител с другими онкомаркерами: АФП, ПСА, СА-125, СА-15-3, РЭА.

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

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации СА 19-9 при разведении анализируемых проб раствором для разведения сывороток не превышает 10% в диапазоне концентраций 15–300 Ед/мл.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА 19-9, предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 30 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 19-9 не превышает 2 Ед/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию СА 19-9 измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 78 здоровых доноров юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–55 лет. Концентрация СА 19-9 не превышала 30 Ед/мл,

при этом средняя концентрация СА 19-9 составляла 6,7 Ед/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации СА 19-9, соответствующие нормальным у здоровых людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными.

4.3. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. 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.

4.4. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время

сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

4.8. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ и 650 об/мин;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 и 100 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50, 100 и 250 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C не более 3 мес.

Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18–25°C.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18–25°C не менее 30 мин.

7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА.

7.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 1 месяца.

7.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: до 5 суток при 2–8°C.

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество рас-

Таблица расхода реагентов

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	ТМБ, концентрат, мл	Субстратный буферный раствор, мл	Концентрат ФСБ-Т, мл	Дистил. вода мл
2	0,2	2,0	0,14	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	0,21	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	0,28	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	0,35	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	0,42	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	0,49	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	0,56	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	0,63	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,70	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,77	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	0,84	12,0	24,0	до 600

творя для разведения конъюгата (РРК), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и пипетки (наконечники), контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагентов внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при температуре 18–25°C в темноте.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

8.1. Внести во все лунки по 50 мкл раствора для разведения сывороток.

8.2. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях. В остальные лунки внести в дублях по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки крови. Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15–20 мин.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

8.4. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 5 раз промывочным раствором (п. 7.4.) с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки. При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.5), заклеить планшет

пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором как указано в п. 8.4.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре 18–25°C.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** во все лунки по 50 мкл РРС.
по 50 мкл калибровочных образцов и контрольного образца в дублях;
по 50 мкл анализируемых образцов в дублях.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с анализируемыми образцами.

11.2. Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации СА 19-9 (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

11.3. Определить содержание концентраций в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации СА 19-9 в образце (см. пример 1).

Пример 1

Калибровочная проба, содержащая СА 19-9	Значение ОП о.е.	Конц-ция СА 19-9 (определенная по графику)
300 Ед/мл	2,792	
150 Ед/мл	2,359	
75 Ед/мл	1,789	
30 Ед/мл	1,048	
15 Ед/мл	0,572	
0 Ед/мл	0,020	
Контрольный образец	1,281	44,13
Анализируемый образец	0,946	26,79

11.4. Если концентрация СА 19-9 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 300 Ед/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

11.5. Контрольный образец служит для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СА 19-9 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

11.6. При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в

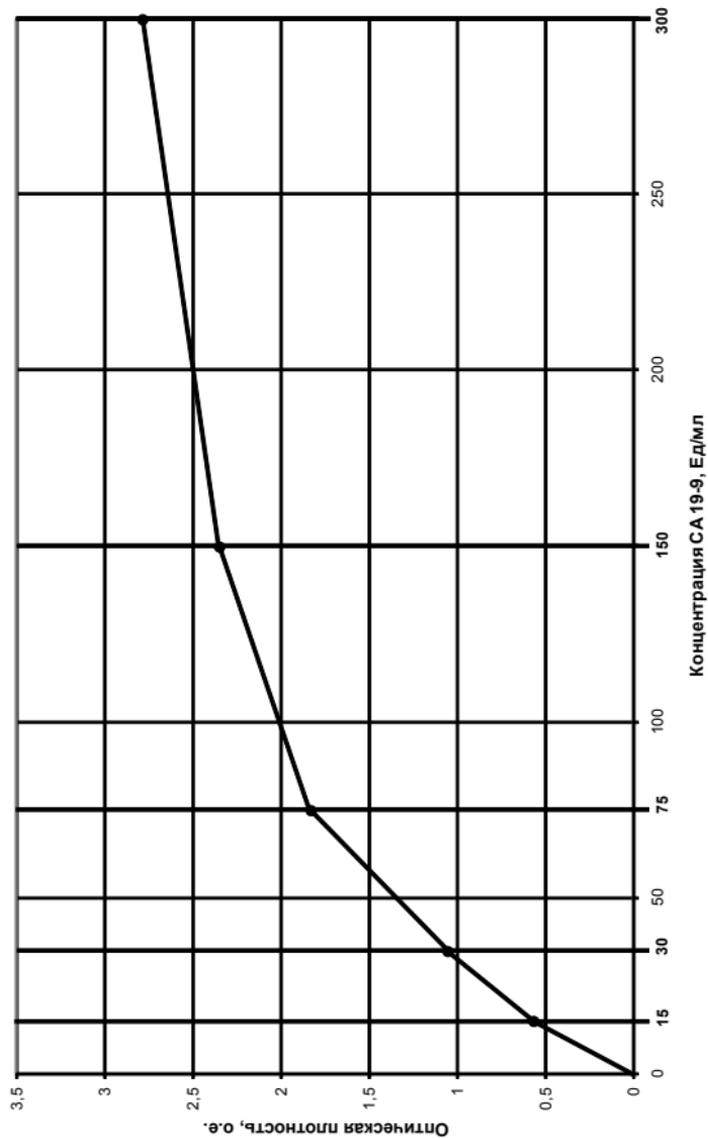


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации СА 19-9 в калибровочных образцах.

спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

11.7. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации СА 19-9 в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор реагентов «СА 19-9 – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес. с момента проведения первого иммуноферментного анализа, **но в пределах срока годности.**

В случае дробного использования набора построение калибровочного графика и определение концентрации СА 19-9 в контрольном образце необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

12.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

12.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора,
следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию ИФА гормонов и опухолевых маркеров,
тел. (383) 336-55-55

26.04.09.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru