

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СА72-4 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «СА72-4-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА72-4-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации СА72-4 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. СА72-4, или углеводный антиген 72-4 с высокой молекулярной массой (м.м. 230 – 1000 кДа), представляет собой антиген (эпитоп), ассоциированный с раком желудка, карциномой яичников и некоторыми другими опухолями. Количественное определение СА72-4 в сыворотке или плазме крови, особенно одновременно с определением углеводного антигена сиалил-Льюиса СА19-9 (ХЕМА кат. № К223) используется в целях контроля течения и терапии рака желудка, а также вместе с СА125 (ХЕМА кат. № К222) – в целях мониторинга рака яичников. СА72-4 в норме практически не экспрессируется здоровыми тканями у взрослых. Увеличенная концентрация углеводного антигена 72-4 отмечается в высоком проценте случаев рака желудочно-кишечного тракта, яичников и легких. Кроме того, повышение уровня СА72-4 обнаруживается у небольшого числа пациентов с разнообразными доброкачественными заболеваниями. В связи с этим, данные по содержанию СА72-4 всегда следует интерпретировать в комплексе с результатами других методов исследования и клиническими данными.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение СА72-4 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к СА72-4 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание СА72-4, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к СА72-4 человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации СА72-4 в исследуемом образце. Концентрацию СА72-4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания СА72-4 в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование мышинных моноклональных антител к СА72-4 позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания СА72-4 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СА72-4-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации СА72-4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей СА72-4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-200 Ед/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА72-4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 15 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «СА72-4-ИФА» концентрация СА72-4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 2 Ед/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P244Z	SORB MTP	Пластишет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C244Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества СА72-4 - 0; 5; 15; 50; 200 Ед/мл, готовы к использованию (по 0.5 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q244Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием СА72-4, готова к использованию (0.5 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
4 T244Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S014Z2	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (22 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K244IR	-	Инструкция по применению Набора реагентов «СА72-4-ИФА»	1	шт.	-
11 K244Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «СА72-4-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. 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.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2-8$ °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «СА72-4-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

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

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2-8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

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

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации СА72-4 в контрольной сыворотке.

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

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация SA72-4 в исследуемом образце превышает 200 Ед/мл, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S014Z2). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки планшет по 100 мкл ИФА-Буфера.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 120 минут при температуре +37 °С .
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С .
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз .
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина . Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25°С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация SA72-4 в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание SA72-4 в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций СА72-4 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (2 Ед/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (200 Ед/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация СА72-4 ниже 2 Ед/мл или выше 200 Ед/мл.

Исследуемая группа	Единицы	
	Ед/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	6.0

11. ЛИТЕРАТУРА

1. DJ Byrne, MC Browning, and A Cuschieri – CA72-4: a new tumour marker for gastric cancer. Br J Surg, Sep 1990; 77(9): 1010-3.
2. Ian J. Jacobs and Usha Menon – Progress and Challenges in Screening for Early Detection of Ovarian Cancer. Mol. Cell. Proteomics, Apr 2004; 3: 355 – 366.
3. R Hamazoe, M Maeta, T Matsui, S Shibata, S Shiota, and N Kaibara – CA72-4 compared with carcinoembryonic antigen as a tumour marker for gastric cancer. Eur J Cancer, Jan 1992; 28A(8-9): 1351-4.

По вопросам, касающимся качества Набора «СА72-4-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
 105043, Москва, а/я 58,
 тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)
 электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
 интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com
 Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
 к. б. н. Д. С. Кострикин