



LIAISON® NSE (314561)
Нейронспецифическая енолаза

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение нейронспецифической енолазы (НСЕ) в человеческой сыворотке и спинномозговой жидкости методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) с помощью анализаторов линейки LIAISON® с целью мониторинга больных с предполагаемыми или диагностированными нейробластомой и мелкоклеточным раком легких.

2. ВВЕДЕНИЕ

Енолаза (фосфопируват гидратаза, 2-фосфо-D-глицерат гидролаза) – фермент, участвующий в метаболизме глюкозы. Он катализирует превращение 2-фосфо-D-глицерата в фосфоенолпируват.

Молекула енолазы состоит из двух субъединиц. Было описано три разных типа субъединиц енолазы: α , β , и γ . α -субъединица енолазы встречается во многих различных тканях, а β -субъединица главным образом в сердце и поперечно-полосатых мышцах. γ -субъединица содержится в нервных клетках и клетках нейроэктодермы. Изоформы енолазы, такие как $\alpha\gamma$ и $\gamma\gamma$, вместе образуют пул нейронспецифической енолазы (НСЕ).

НСЕ обнаруживается в злокачественных опухолях с нейроэндокринной дифференциацией, к наиболее важным из которых можно отнести нейробластому и мелкоклеточный рак легких. НСЕ присутствует в цитоплазме и выделяется в кровообращение путем разрушения клеток. Таким образом, уровень НСЕ связан со скоростью гибели клеток.

Описано, что НСЕ является ценным маркером у пациентов с подозрением или диагнозом мелкоклеточный рак легкого или нейробластома для подтверждения диагноза, контроля эффекта лечения и выявления рецидивов заболевания. НСЕ также является ценным параметром для определения степени заболевания. Значения при диагностике значительно выше у пациентов с обширным заболеванием по сравнению с заболеванием с ограниченной стадией.

Мелкоклеточный рак легких составляет около 20% всех случаев рака легких. В отличие от немелкоклеточного рака легкого первичный мелкоклеточный рак легкого в основном очень хорошо реагирует на цитостатическую или лучевую терапию. За успешным лечением может последовать снижение уровня НСЕ. Рецидивирующее заболевание может быть выявлено путем повышения уровня НСЕ.

Сравнение различных параметров при раке легкого показывает, что НСЕ является маркером выбора для мелкоклеточного рака легкого, тогда как цитокератин 19 / ТРА является наиболее подходящим маркером немелкоклеточного рака легкого.

НСЕ также использовался в качестве маркера при различных видах церебральных заболеваний, таких как черепно-мозговая травма, инсульт и остановка кровообращения, в основном для мониторинга тяжести травмы и в качестве раннего предиктора исхода.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод количественного определения НСЕ представляет собой 1-ступенчатый хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA) по принципу сэндвича. Два разных типа высоко специфичных мышинных моноклональных антител к НСЕ связаны с магнитными микрочастицами (твердая фаза) и мечены производным изолюминола (конъюгат антител с красителем). Во время инкубации молекулы НСЕ, присутствующие в калибраторах, контролях и пробах, одновременно связываются с антителами твердой фазы и с антителами, меченными изолюминолом. Сэндвич образуется только при наличии в пробе молекул НСЕ. После инкубации не связавшиеся молекулы удаляются во время цикла промывки. Затем к реакционной смеси добавляются реактивы для активации, индуцирующие хемилюминесцентную реакцию. Интенсивность люминесценции, измеряемая с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, отражает концентрацию НСЕ в калибраторах, контролях и пробах пациентов.

4. СОСТАВ НАБОРА

Магнитные частицы (2,3 мл)	Магнитные частицы, покрытые мышинными моноклональными антителами к НСЕ; фосфатный буфер; БСА; 0,09% азид натрия.
Калибратор 1 (1,5 мл)	Человеческий антиген НСЕ (мозговая ткань человека); 0,09% азид натрия.
Калибратор 2 (1,5 мл)	Человеческий антиген НСЕ (мозговая ткань человека); 0,09% азид натрия.
Конъюгат (14 мл)	Мышинные моноклональные антитела к НСЕ, меченные производным изолюминола (аминобутилэтилизололюминолом); фосфатный буфер; БСА; 0,09% азид натрия.
Раствор для разведения образцов (4 мл)	содержит 0,09% азид натрия.
Количество определений	100

Все реагенты готовы к использованию. Порядок расположения реактивов в таблице отражает их расположение в картридже реактивов.

Необходимые материалы, не входящие в набор

Анализатор LIAISON® XL	Анализатор LIAISON®
Кюветы (каталожный номер X0016). Одноразовые наконечники (каталожный номер X0015). Набор запускающих реактивов XL (каталожный номер 319200). Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100). Мешки для отходов XL (каталожный номер X0025)	Реакционные модули (каталожный номер 319130). Набор запускающих реактивов (каталожный номер 319102) или набор запускающих реактивов XL (каталожный номер 319200). Реактив для ежедневной проверки анализатора (каталожный номер 319150). Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100). Мешки для отходов (каталожный номер 450003). Набор растворов для обслуживания анализатора (каталожный номер 310990).

Дополнительные материалы, рекомендованные для работы

Контроль НСЕ (каталожный номер 319108)

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Только для *In vitro* диагностики.

Все образцы человеческой сыворотки/плазмы, использованные для производства набора, были протестированы на наличие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2, а также HBs-антигена и были признаны отрицательно реагирующими в вышеуказанных тестах. Но, поскольку не существует метода исследований, который бы гарантировал полную инфекционную безопасность биоматериалов человеческого происхождения, рекомендуется обращаться с набором, как с потенциально инфекционным.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не употребляйте пищу, напитки, не курите и не наносите косметику в лаборатории, где проводятся анализы.

Не пипетируйте растворы ртом.

Избегайте прямого контакта со всеми потенциально инфекционными материалами, надевая защитную одежду, такую как лабораторные халаты, защитные очки и одноразовые перчатки. В конце каждого анализа тщательно мойте руки.

Избегайте всплесков или образования аэрозолей. Любую утечку биологического реагента следует смыть с помощью раствора гипохлорита натрия с 0,5%-ным активным хлором и утилизировать как инфекционные отходы.

Все образцы и реагенты, содержащие биологические материалы, используемые в анализе, должны считаться потенциально способными передавать инфекционные агенты. С отходами следует обращаться с осторожностью и утилизировать их в соответствии с лабораторными нормами и нормами законов, действующими в стране. Любые материалы, подлежащие повторному использованию, должны быть надлежащим образом стерилизованы в соответствии с местными законами и нормами.

Проверяйте эффективность цикла стерилизации/обеззараживания.

Реагенты, содержащие азид натрия (<0,1 %) [EC №247-852-1]:

DIRECTIVE	EC No. 1272/2008
HAZARD / RISK STATEMENTS	EUH 210 - Safety data sheet available on request

7. ПОДГОТОВКА ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

7.1 Интегральный картридж реактивов.

Пожалуйста, обратите внимание на следующие важные меры предосторожности при работе с реагентами:

Ресуспендирование магнитных частиц

Магнитные частицы должны быть полностью ресуспендированы до того, как интеграл будет помещен в прибор. Чтобы обеспечить полное ресуспендирование частиц, выполните следующие действия:

Перед удалением алюминиевых мембран с флаконов, проверните колесо флакона с магнитными частицами, пока цвет суспензии не станет равномерно коричневым. Аккуратно перемешайте их содержимое, держа интеграл горизонтально, чтобы избежать пенообразования. Осмотрите нижнюю часть флакона, чтобы убедиться, что все магнитные частицы были ресуспендированы.

При необходимости повторите процедуру до полного ресуспендирования магнитных частиц.

После удаления алюминиевой мембраны тщательно протрите поверхность каждого флакона для удаления остатков жидкости, если необходимо.

Вспенивание реагентов

Чтобы обеспечить оптимальные рабочие характеристики интеграла, следует избегать пенообразования реагентов. Придерживайтесь приведенных ниже рекомендаций по предотвращению вспенивания:

Перед использованием интеграла осмотрите реагенты, чтобы убедиться в отсутствии пены. Если после ресуспендирования магнитных частиц пена появилась, поместите интеграл в анализатор и подождите, пока пена исчезнет. Интеграл готов к использованию только тогда, когда пена исчезла, а интеграл с ресуспендированными частицами находится на борту.

Установка интеграла в область загрузки реактивов

Анализатор LIAISON®

- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 30 минут. Анализатор автоматически перемешает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

Анализатор LIAISON® XL

- Анализатор LIAISON® XL оснащен встроенным твердотельным магнитным устройством, которое помогает ресуспендировать микрочастицы до размещения интеграла с реагентами в области загрузки реактивов анализатора. Для уточнения деталей обратитесь к руководству по эксплуатации анализатора.
 - а. Вставьте интеграл с реагентами в специальный разъем.
 - б. Оставьте интеграл с реагентами в твердотельном магнитном устройстве, по крайней мере, на 30 секунд (допускается до нескольких минут). Повторите по мере необходимости.
- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 15 минут. Анализатор автоматически перемешает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

7.2 Контроли

Для правильной хранения, подготовки и постановки и набора контрольных материалов LIAISON® Control NSE Set следовать соответствующей инструкции.

8. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

Всегда храните интегралы в вертикальном положении, в противном случае последующее перемешивание магнитных частиц будет затруднено. Избегайте попадания прямых солнечных лучей.

Невскрытые реактивы стабильны до окончания срока годности при условии их хранения в вертикальном положении при температуре 2-8°C. Запрещается замораживать реактивы, входящие в состав картриджа. Запрещается использовать интеграл после окончания срока годности, указанного на этикетке интеграла. После вскрытия интеграла (удаления алюминиевых мембран) его содержимое стабильно в течение **2 недель** при условии хранения при температуре 2-8°C в холодильнике или на борту анализатора.

9. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Сыворотка и спинномозговая жидкость. НСЕ также содержится в тромбоцитах и эритроцитах и может попасть в сыворотку в результате их лизиса. В связи с этим запрещается использовать пробы цельной крови и плазмы. Забор крови должен быть проведен до любого терапевтического воздействия: и первичного, и повторного. Сыворотка должна быть отделена от клеток после забора крови как можно скорее: коагуляция крови не более 20-30 минут при комнатной температуре, центрифугирование в течение 10 минут при 800-1000 грм. Продолжительное хранение крови может привести к выходу НСЕ из клеток в сыворотку. Мутные, липемичные пробы, а также пробы с твердыми частицами и дебрисом эритроцитов перед исследованием могут потребовать дополнительной очистки путем фильтрации или центрифугирования. Не рекомендуется исследовать сильно гемолизированные и липемичные пробы, а также пробы с признаками бактериальной контаминации. Перед установкой пробы в анализатор необходимо удалить все пузыри с ее поверхности.

Стабильность: 24 часа при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения (до 1 месяца) пробы должны быть заморожены при температуре -20°C или ниже. После разморозки пробу необходимо аккуратно перемешать. Избегайте повторного замораживания пробы.

Минимально необходимый объем 175 µл (25 µл на исследование + 150 µл мертвый объем).

10. КАЛИБРОВКА

Исследование калибраторов, входящих в состав интеграла, позволяет перекалибровать мастер-кривую, хранящуюся в памяти анализатора, с использованием значений концентрации калибраторов, зашифрованных в штрих-коде этикетки интеграла. Каждый калибратор рассчитан на 12 использований.

Калибровка должна быть проведена в трех повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов.
- Прошло более 5 дней с момента последней калибровки.
- Используется новый набор реактивов.
- Было проведено обслуживание анализатора.
- Результаты исследования контрольных сывороток выходят за пределы допустимого диапазона.

Анализатор LIAISON®: значения концентраций калибратора содержатся в штрих-коде интеграла.

Анализатор LIAISON® XL: значения концентраций калибратора содержатся в радиочастотной метке.

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Строгое следование рекомендациям инструкции пользователя гарантирует получение корректных результатов.

Анализатор LIAISON®. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в штрих-коде этикетки интеграла. Если информации с штрих-кода не читается, то картридж является непригодным к использованию. Не утилизируйте реагентный интеграл и свяжитесь с региональными представителями DiaSorin для получения дальнейших инструкций.

Анализатор LIAISON® XL. Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в радиочастотной метке интеграла. Если информации с радиочастотной метки не читается, то картридж является непригодным к использованию. Не утилизируйте реагентный интеграл и свяжитесь с региональными представителями DiaSorin для получения дальнейших инструкций.

Процедура анализа, выполняемого анализатором LIAISON, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание калибраторов, контролей или проб в кюветы реакционного модуля.
2. Добавление магнитных частиц и конъюгата.
3. Инкубация.
4. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
5. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности свечения.

Процедура анализа, выполняемого анализатором LIAISON XL, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание магнитных частиц и конъюгата в кюветы.
2. Добавление калибраторов, контролей или проб.
3. Инкубация.
4. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
5. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности свечения.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна установить частоту проведения контроля качества самостоятельно.

Для контроля качества необходимо использовать контроль производства компании DiaSorin или другой коммерческий контроль:

- а. по меньшей мере 1 раз в день перед постановкой проб пациентов
- б. каждый раз при использовании нового реагентного картриджа
- в. Каждый раз после калибровки набора
- г. каждый раз при использовании нового лота Starter Kit
- д. для того, чтобы оценить адекватность работы открытого интеграла через 2 недели в соответствии с руководящими принципами или требованиями местных нормативных актов или аккредитованных организаций.

Контроли LIAISON® следует ставить в 1 повторности для контроля эффективности анализа. Контрольные значения должны лежать в пределах ожидаемого диапазона: всякий раз, когда один или оба контроля находятся за пределами ожидаемых диапазонов, следует провести калибровку и повторить тестирование контроля. Если контрольные значения, полученные после успешной калибровки, повторно выходят за пределы предварительно определенных диапазонов, тестирование следует повторить с использованием неоткрытого контрольного флакона. Если контрольные значения лежат вне ожидаемых диапазонов, результаты не должны сообщаться пациенту. Эффективность других контролей должна оцениваться на совместимость с данным анализом перед их использованием. Затем следует установить соответствующие диапазоны значений для используемых материалов контроля качества.

13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию HCE в мкг/л. За более подробной информацией обратитесь к Инструкции пользователя.

Результаты измерений калибраторов и контролей анализаторами LIAISON® и LIAISON® XL в относительных световых единицах (RLU) или концентрационных единицах могут различаться, но результаты анализов проб пациентов будут одинаковыми.

13.1 Диапазон исследования

До 200 мкг/л HCE.

13.2 Референсные границы

В соответствии с общепринятой лабораторной практикой каждая лаборатория должна установить собственные референсные значения, отражающие их типовую популяцию. В качестве ориентировочных значений можно использовать приведенные ниже данные.

Исследование с помощью набора реактивов LIAISON® NSE проб здоровых мужчин и женщин показало, что нормальные значения концентрации HCE составляют 0-18,3 мкг/л в сыворотке и менее 13 мкг/л в СМЖ (95%-я перцентиль).

14. ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагенты следует использовать только в семействе анализаторов LIAISON®

Отдельные компоненты интеграла реагента не должны быть удалены из интеграла.

Этот комплект нельзя использовать после истечения срока годности, указанного на этикетке упаковки.

Строгое следование инструкциям к прибору и реактиву необходимо для получения достоверных результатов. Бактериальная контаминация, повторное замораживание или нагревание пробы могут повлиять на результат исследования.

Уровни NSE в сыворотке можно интерпретировать только в контексте клинической картины и других диагностических процедур. Любое терапевтическое решение также должно приниматься в каждом конкретном случае.

Несмотря на то, что добавляются НАМА-нейтрализующие агенты, чрезвычайно высокие концентрации НАМА (человеческих антител против мыши) могут иногда влиять на результаты.

Образцы, содержащие уровни НСЕ выше диапазона измерения, могут быть предварительно разбавлены разбавителем.

Запрещается обмениваться интегралами между анализаторами LIAISON® и LIAISON® XL. Интеграл, однажды установленный на анализатор определенного типа, должен использоваться на этом анализаторе до самого конца. Запрещается оценивать динамику концентрации по результатам, полученным на разных типах анализаторов. Такие измерения должны быть выполнены на одном конкретном типе анализатора (либо LIAISON®, либо LIAISON® XL).

15. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

15.1 Аналитическая специфичность.

Аналитическую специфичность можно определить, как способность теста безошибочно выявлять специфический аналит в присутствии потенциально мешающих факторов в матриксе пробы (например, антикоагулянтов, гемолиза, результата обработки пробы).

15.2 Интерференция.

Контролируемые исследования потенциально мешающих факторов или условий продемонстрировали, что характеристики теста не менялись в присутствии липемии (вплоть до концентрации триглицеридов 30 мг/мл), билирубинемии (вплоть до концентрации билирубина 0,2 мг/мл). Визуально гемолитичные пробы использовать для исследования нельзя (абсорбция пробы при длине волны 415 нм не должна превышать 0,3 единиц).

15.3 Точность при исследовании на анализаторе LIAISON®

Различные пробы, содержащие разные концентрации специфического аналита, были проанализированы с целью определения повторяемости и воспроизводимости теста (то есть вариабельности внутри серии и между сериями).

Вариация внутри серии			Вариация между сериями		
Среднее значение (мкг/л)	КВ (%)	Кол-во	Среднее значение (мкг/л)	КВ (%)	Кол-во
17,9	0,9	15	17,9	5,3	15
37,3	2,3	15	37,3	4,5	15
72,8	2,2	15	72,8	4,0	15
105,6	1,9	15	105,6	4,6	15

15.4 Точность при исследовании на анализаторе LIAISON® XL

Различные пробы, содержащие разные концентрации специфического аналита, были проанализированы с целью определения повторяемости и воспроизводимости теста (то есть вариабельности внутри серии и между сериями).

Вариация внутри серии			Вариация между сериями		
Среднее значение (мкг/л)	КВ (%)	Кол-во	Среднее значение (мкг/л)	КВ (%)	Кол-во
10,2	2,7	20	8,0	3,7	20
15,0	1,7	20	15,5	3,7	20
39,8	1,7	20	33,1	3,8	20
90,5	1,4	20	82,0	5,9	20

15.5 Правильность исследования

Правильность исследования была определена с помощью теста разведения и восстановления.

15.6 Тест разведения.

Пробы (сыворотка) с высокой концентрацией НСЕ были исследованы перед и после разведения. Результаты были проанализированы с помощью метода линейной регрессии. В таблице представлены результаты исследования разведенной сыворотки кпроби, начальная концентрация 207,6 мкг/л

Разведение	Полученные значения (мкг/л)	Ожидаемые значения (мкг/л)	Восстановление (%)
1:2	100,4	103,8	97
1:4	49,1	51,9	95
1:8	25,2	26,0	97
1:16	12,5	13,0	96
1:32	5,8	6,5	89

15.7 Тест восстановления.

Пробы с внесением НСЕ были исследованы с помощью LIAISON® NSE.

В таблице представлены результаты восстановления проб сыворотки (8,7 мкг/л) с разным внесением НСЕ.

Полученные значения (мкг/л)	Ожидаемые значения (мкг/л)	Восстановление (%)
12,3	11,9	103
20,4	21,4	96
38,8	39,8	98
98,1	103,2	95

15.8 Эффект высокой дозы

Эффекта насыщения не наблюдалось до концентрации НСЕ 1500 мкг/л.

При исследовании проб с крайне высокой концентрацией аналита, может наблюдаться эффект занижения результатов за счет влияния эффекта насыщения. Оценка влияния эффекта насыщения была проведена путем исследования пяти высококонцентрированных НСЕ-смешанных образцов. Результат анализа, как и ожидалось, превышал верхнюю границу измеряемого диапазона и, значит, не привел к ошибочной классификации пробы.

15.9 Аналитическая чувствительность

определенная как минимальная концентрация от 0 с 2 стандартными отклонениями составила менее $\leq 0,04$ мкг/л.