



LIAISON® TPA-M (314121)
Тканевый полипептидный
антиген

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение тканевого полипептидного антигена (ТПА-M) в человеческой сыворотке методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) с помощью анализаторов линейки LIAISON® с целью мониторинга больных с опухолями, имеющими эпителиальное происхождение (например, карциномы легких, молочной железы, желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря).

2. ВВЕДЕНИЕ

ТПА-M представляет собой комплекс, состоящий из полипептидных фрагментов цитокератинов 8, 18 и 19. Эти три цитокератина характерны для внутреннего эпителия и широко распространены в нормальных тканях и в опухолях, образованных из них. Эпителиальные клетки демонстрируют характерную комбинацию двух или более цитокератинов. Характер экспрессии обычно сохраняется во время злокачественной трансформации.

Концентрация TPA® в сыворотке коррелирует с пролиферацией клеток. Механизм, стоящий за этим, заключается в том, что вероятность разрыва клетки выше, если клетки делятся чаще. Разрыв клеток приводит к высвобождению содержимого клеток, в том числе цитокератинов.

Цитокератины характеризуются крайней нерастворимостью в водных системах. Поэтому TPA®, обнаруженный в кровотоке, состоит из протеолитических фрагментов цитокератинов, обнаруженных в ткани.

TPA® является общим маркером карциномы, который отражает злокачественный рост в различных органах. Клиническое значение TPA® было показано при раке мочевого пузыря, молочной железы, желудочно-кишечного тракта, легких, яичника и простаты. TPA® в нескольких исследованиях показал очень высокую чувствительность к раку молочной железы. Комбинация высокоспецифичного маркера CA 15-3 с менее специфичным, но более чувствительным TPA® повышает чувствительность и предоставляет дополнительную информацию во время мониторинга и наблюдения пациентов с раком молочной железы.

Многочисленные публикации показали, что TPA® является очень чувствительным маркером рака легких. TPA® полезен для мониторинга течения заболевания и в качестве раннего показателя рецидива во время наблюдения, особенно при НМРЛ (немелкоклеточный рак легких). Уровень в сыворотке также хорошо коррелирует с опухолевой нагрузкой и степенью заболевания.

Также было показано, что для других карцином сывороточные уровни TPA® хорошо коррелируют со скоростью роста клеток и опухолевой нагрузкой. Уровни сыворотки в основном повышены при метастатическом и диссеминированном заболевании. Таким образом, TPA® полезен как прогностический маркер и для мониторинга лечения пациентов с различными карциномами. Сообщалось, что повышенные значения предшествуют клиническим симптомам рецидивирующего заболевания на несколько месяцев.

Высокие значения TPA® иногда обнаруживаются при некоторых незлокачественных состояниях, таких как гепатит, цирроз печени, инфекции желчных путей и инфекции дыхательных путей. В этих условиях TPA® возвращается к норме после того, как прошло острое состояние, в то время как прогрессирующее злокачественное заболевание демонстрирует устойчиво высокое и часто увеличивающееся значение TPA® в сыворотке.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод количественного определения ТПА представляет собой 2-ступенчатый хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA) по принципу сэндвича. Смесь из трех высоко специфичных мышинных моноклональных антител к различным эпитопам цитокератинов 8, 18 и 19 связана с магнитными микрочастицами (твердая фаза), поликлональные лошадиные антитела к цитокератинам мечены производным изолоуинола (конъюгат антител с красителем). Во время первой инкубации комплексы ТПА, присутствующие в калибраторах, контролях и пробах, связываются с антителами твердой фазы. Во время второй инкубации антитела, меченные изолоуинолом, взаимодействуют с молекулами комплекса ТПА, уже фиксированными на твердой фазе. Сэндвич образуется только при наличии в пробе молекул ТПА. После каждой 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 ТПА в калибраторах, контролях и пробах пациентов.

4. СОСТАВ НАБОРА

| | |
|----------------------------|---|
| Магнитные частицы (2,3 мл) | Магнитные частицы, покрытые мышинными моноклональными антителами к ТПА. |
| Калибратор 1 (2 мл) | ТПА; человеческий сывороточный альбумин, 0,09% азид натрия. |

| | |
|---|---|
| Калибратор 2 (2 мл) | ТПА; человеческий сывороточный альбумин, 0,09% азид натрия. |
| Конъюгат (12 мл) | Лошадиные поликлональные антитела к ТПА, меченные изолюмином. |
| Раствор для разведения образцов (25 мл) | 0,09% азид натрия. |
| Буфер А (13 мл) | 0,09% азид натрия. |
| Количество определений | 100 |

Все реактивы готовы к использованию.

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). | 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 XL (каталожный номер X0025) | 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 ТПА (каталожный номер 319107)

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 инфекционными.

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 %) [ЕС №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 перемешивает 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 перемешивает 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® TPA® (кат.№ 319107) 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

Для количественного определения ТПА рекомендуется использовать сыворотку. Забор крови должен быть проведен до любого терапевтического воздействия: и первичного, и повторного. Количество крови должно быть достаточным для проведения повторного исследования. 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 пузырьки с ее поверхности. Стабильность: 24 часа при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения пробы должны быть заморожены при температуре -20°C или ниже. После разморозки пробу необходимо тщательно перемешать (5 сек на вортексе). Избегайте повторного замораживания пробы.

Минимально необходимый объем 250 µл (100 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 5 использований.

Калибровка должна быть проведена в двух повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов.
- Прошло более 14 дней с момента последней калибровки.
- Используется новый интеграл (рекомендация).
- 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, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание калибраторов, контролей, проб и буфера А в кюветы реакционного модуля.
2. Добавление магнитных частиц.
3. Инкубация.
4. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
5. Добавление конъюгата.
6. Инкубация.
7. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
8. 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 ТПА® в Ед/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 4500 Ед/л концентрации ТПА®.

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® TPA-M® проб здоровых мужчин и женщин показало, что нормальные значения концентрации ТПА составляют 0-75 Ед/л (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 или нагревание пробы может повлиять на результат исследования.

Пробы пациентов, получающих препараты мышинных моноклональных антител в целях терапии или диагностики, могут содержать анти-мышинные антитела (НАМА). Результаты исследования таких проб с помощью иммунологических методик, основанных на использовании моноклональных антител, могут быть завышены или занижены. Несмотря на то, что НАМА-нейтрализующие компоненты входят в состав реактивов, слишком высокие концентрации НАМА могут случайным образом

исказить результаты измерений.

Концентрация ТПА в крови опухолевых больных с карциномами может лежать в пределах нормы. Повышенный уровень ТПА также может наблюдаться и в ряде незлокачественных заболеваний, таких как гепатит, цирроз печени или инфекции желчевыводящих и дыхательных путей. В этих случаях концентрация ТПА возвращается к нормальному уровню после завершения острой фазы заболевания, тогда как в случае прогрессирующей опухоли постоянно наблюдается высокий уровень ТПА, который со временем может возрастать.

Интерпретация результатов определения ТПА может проводиться только вместе с данными истории болезни и других диагностических исследований.

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, гемолиза, липемии или билирубинемии).

15.2 Интерференция: контролируемые исследования потенциально мешающих факторов или условий продемонстрировали, что характеристики теста не менялись в присутствии гемолиза (вплоть до концентрации гемоглобина 1000 мг/дл), липемии (вплоть до концентрации триглицеридов 30 мг/мл), билирубинемии (вплоть до концентрации билирубина 0,2 мг/мл).

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 (Ед/л) | КВ (%) | Кол-во | Среднее значение (Ед/л) | КВ (%) | Кол-во |
| 83,03 | 3,5 | 20 | 98,31 | 8,0 | 20 |
| 219,55 | 3,1 | 20 | 129,01 | 5,4 | 20 |
| 368,30 | 3,9 | 20 | 323,96 | 4,9 | 20 |
| 757,55 | 3,5 | 20 | 460,73 | 7,7 | 20 |

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 (Ед/л) | КВ (%) | Кол-во | Среднее значение (Ед/л) | КВ (%) | Кол-во |
| 69,55 | 2,2 | 20 | 66,55 | 3,0 | 20 |
| 190,49 | 1,3 | 20 | 112,47 | 3,6 | 20 |
| 364,62 | 1,7 | 20 | 324,69 | 3,7 | 20 |
| 751,00 | 1,3 | 20 | 691,34 | 2,6 | 20 |

15.5 Правильность исследования

Правильность исследования была определена с помощью теста разведения и восстановления.

15.6 Тест разведения.

Пробы (сыворотка) с высокой концентрацией ТПА® были исследованы перед и после разведения. Результаты были проанализированы с помощью метода линейной регрессии. В таблице представлены результаты линейного разведения проб. Начальная концентрация: 203 Ед/мл.

| Разведение | Полученные значения (Ед./л) | Ожидаемые значения (Ед./л) | Восстановление (%) |
|------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1:2 | 112,0 | 102,0 | 110 |
| 1:4 | 56,2 | 50,8 | 111 |
| 1:8 | 29,4 | 25,4 | 116 |
| 1:16 | 16,3 | 12,7 | 129 |
| 1:32 | 9,8 | 6,3 | 155 |

15.7 Тест восстановления.

Пробы с внесением ТПА® были исследованы с помощью LIAISON® TPA®.

В таблице представлены результаты восстановления разного количества ТПА® внесением натуральной сыворотки.

| Полученные значения (Ед/л) | Ожидаемые значения (Ед/л) | Восстановление (%) |
|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| 331 | 381 | 87 |
| 641 | 706 | 91 |
| 1122 | 1362 | 82 |
| 2523 | 2670 | 95 |

15.8 Эффект высокой дозы

Эффекта насыщения не наблюдалось до концентрации ТПА® 500 000 Ед/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 ТПА® -смешанных образцов. Результат анализа, как и ожидалось, превышал верхнюю границу измеряемого диапазона и, значит, не привел к ошибочной классификации пробы.

15.9 Аналитическая и функциональная чувствительность:

Аналитическая чувствительность:

определенная как минимальная концентрация от 0 с 2 стандартными отклонениями составила менее < 3,0 Ед/л.

Функциональная чувствительность:

определенная как концентрация внутри серии, коэффициент вариации которой <20% составила <9 Ед/л.