

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»
Е.Н. Схолль-Энгбертс
«23» _____ 2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИГЕНА СА 15-3
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(СА 15-3-Имаксиз (IMAXYZ))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА 15-3-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации антигена СА 15-3 в сыворотке крови человека.

Сывороточный маркер СА 15-3 входит в семейство белков-муцинов (MUC), которое составляют высокомолекулярные (200 - 500 кДа) поверхностные гликопротеины. Считается, что антиген СА 15-3 (белок MUC1) вовлечен в процессы клеточной адгезии, метастазирования и реализации иммунного ответа. Показано, что по сравнению со здоровыми клетками молочной железы MUC1 в образцах распространенного рака молочной железы (РМЖ) присутствует в более высокой концентрации, но менее гликозилирован. При опухолях другой локализации (карцинома яичников, шейки матки, эндометрия) повышенный уровень СА 15-3 (MUC1) может регистрироваться только на поздних стадиях заболевания. При раннем РМЖ подъем уровня СА 15-3 отмечается редко и его максимальная чувствительность (даже в сочетании с другими опухолевыми маркерами) не превышает 30%. Поэтому определение уровня СА 15-3 **не может использоваться в качестве скринингового теста** для диагностики онкологических заболеваний.

Небольшое повышение концентрации СА 15-3 может так же отмечаться при циррозе, гепатите, аутоиммунных расстройствах,

доброкачественных заболеваниях яичников, при беременности (3-й семестр) и лактации.

Измерение уровня СА 15-3 используется для мониторинга эффективности проводимой терапии, поскольку повышение или понижение его уровня коррелирует с развитием болезни или ремиссией. Кроме того, исследования показывают, что возрастание уровня СА 15-3 после проведенной первичной терапии может указывать на рецидив заболевания еще задолго до появления первых клинических симптомов.

СА 15-3 является более чувствительным, чем РЭА индикатором рецидива РМЖ, а в комбинации с СА 125 может быть использован для ранней диагностики рецидива рака яичников.

1.2. Набор «СА 15-3-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно. Всего – 96 определений.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «СА 15-3-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к СА 15-3. Другие моноклональные антитела к СА 15-3 конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание СА 15-3, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и взаимодействие связавшегося СА 15-3 с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к СА 15-3, что позволяет использовать их для реализации одностадийного высокоспецифичного анализа.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими СА 15-3. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации СА 15-3 в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках проводится расчет концентрации СА 15-3 в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ

1 упаковка

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованными мышинными моноклональными антителами к СА 15-3, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к СА 15-3».

КОНЪЮГАТ

1 флакон, 14 мл

Конъюгат моноклональных антител к СА 15-3 с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Содержат известные количества СА 15-3.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **0** Ед/мл СА 15-3, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **10,8** Ед/мл СА 15-3, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **27** Ед/мл СА 15-3, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **54** Ед/мл СА 15-3, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **135** Ед/мл СА 15-3, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **270** Ед/мл СА 15-3, маркирован «Калибровочная проба №6».

ПРИМЕЧАНИЕ: точные номиналы калибровочных проб указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон, 0,5 мл

Маркирован «Контрольная сыворотка», содержит известное количество СА 15-3, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ

1 флакон, 50 мл

образцов сыворотки крови,

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р»

РАСТВОР ТМБ

1 флакон, 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон, 14 мл

1М соляная кислота (HCl), маркирован «Стоп-реагент».

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР.

1 флакон, 20 мл

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

Дополнительно в состав набора входят:

- защитная пленка для микропланшетов;
- пакет полиэтиленовый закрывающийся.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 15-3 в сыворотке крови человека не превышает 0,5 Ед/мл.

4.2. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител (иммобилизованного и конъюгированного с пероксидазой) с антигенами: ПСА, СА 125, СА 19-9, РЭА, СА 72-4, АФП, ХГч.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 15-3 в образцах сыворотки крови при разведении «Буфером Р», имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

4.4. Точность. Соответствие измеренной концентрации СА 15-3 в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.5. Коэффициент вариации результатов определения СА 15-3 в одном и том же образце с использованием набора «СА 15-3-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборе реагентов «СА 15-3-Имаксиз (IMAXYZ)» хук-эффект не обнаружен до концентрации 6000 Ед/мл.

4.7. Набор реагентов содержит специальные добавки, позволяющие исключить влияние на результаты анализа анти-мышинных антител (НАМА) и гетерофильных антител. Однако чрезвычайно высокие концентрации НАМА и гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

4.8. Клиническая проверка. У 99% здоровых пациентов уровень СА 15-3 не превышает 37 Ед/мл.

Измерение концентрации СА 15-3 не может использоваться в качестве скринингового теста для постановки диагноза, а результат измерения не является основанием для назначения какой-либо терапии без подтверждения другими клиническими исследованиями.

При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций СА 15-3, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной *in vitro* диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, необходимо с калибраторами, контрольными материалами обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инаktivированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°C, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инаktivированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты или 0,5 М раствор серной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.8. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

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

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.

- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.

- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.

- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл или аналогичные.

- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизованной, мутной или гиперлипемичной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азида натрия.

7.4. Если предполагается транспортировка образцов, сыворотка должна быть отделена от кровяного сгустка перед транспортировкой.

7.5. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение **24 часов** с момента получения при условии их хранения при $+2...8^{\circ}\text{C}$. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C . Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

8.2. Предварительное разведение исследуемых образцов. Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и контрольной сыворотки) должны быть разведены Буфером Р в 51 раз:

- 500 мкл Буфера Р + 10 мкл исследуемого образца
- или 1000 мкл Буфера Р + 20 мкл исследуемого образца.

Тщательно перемешать.

Если значения СА 15-3 в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует **дополнительно** развести Буфером Р в 20 раз:

- 190 мкл Буфера Р + 10 мкл предварительно разведенного в 51 раз исследуемого образца. Тщательно перемешать.

Разведение сывороток крови пациентов следует проводить только непосредственно перед проведением анализа. Хранение разведенных образцов не допускается.

8.3. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.4. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

8.5. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера П развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Готовый к использованию «Промывочный буфер» хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный «Буфер П» хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности

8.6. Конъюгат анти-СА 15-3-пероксидаза готов к использованию.

8.7. Раствор ТМБ готов к использованию.

8.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8.9. Буфер Р готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 25 мкл предварительно разведенной исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.*

9.3. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл Конъюгата.

9.4. Аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 1-2 минут.

9.5. Заклеить микропланшет специальной пленкой, входящей в состав набора.

9.6. Инкубировать стрипы в течение 2 часов при температуре +18...+25°C без встряхивания.

9.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.5, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом

положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 1**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках A1 и A2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках A1 и A2 не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации СА 15-3 в калибровочных пробах (Ед/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. При наличии автоматической программы расчета на фотометре в качестве метода аппроксимации калибровочной кривой выбрать метод 4PL, 5PL или кубический сплайн.

11.4. Определить содержание СА 15-3 в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА 15-3 умножить на фактор разведения.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них СА 15-3. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации СА 15-3 в образцах сывороток пациентов:

Срок годности набора — 18 месяцев. Не допускается использование серии набора после истечения срока ее годности.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

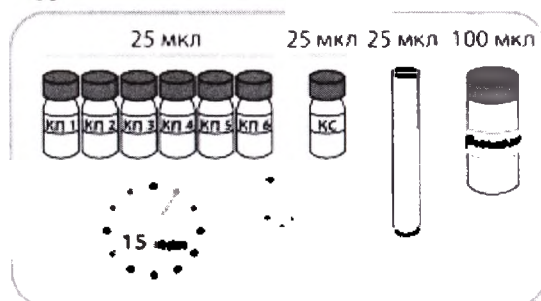
- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C;
- Калибровочные пробы, «Буфер Р» и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C;
- «Буфер П» и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.
- Промывочный буфер, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C). Не добавлять в емкость с используемым промывочным буфером вновь приготовленный раствор.

13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

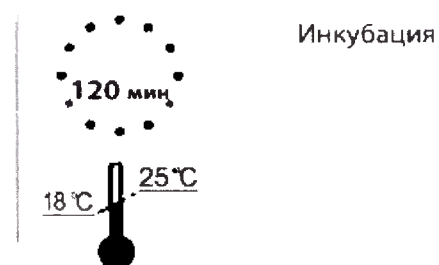
14.1. Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г».

1.



2.

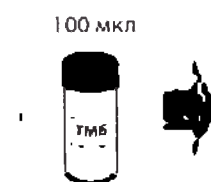
3.



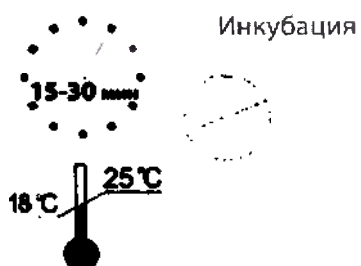
4.



5.



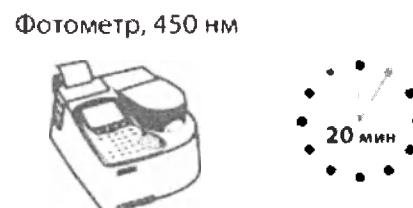
6.



7.



8.



По вопросам качества набора обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194156, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д. 27, корп. 38, лит. К, пом. 18,19, тел./факс (812)326-61-98 или на кафедру КЛД в ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России по адресу: 125284, Москва, 2 Боткинский проезд, д.5. Телефон: +7 (495) 945-82-22.

Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс.

Заведующий кафедрой
клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.

19 НОЯ 2014

ПРОШУ
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«19» ноя 20 14 год

Зав. кафедрой клинической
лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России, д.м.н., профессор

Долгов В.В.

