

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов
_____ 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации опухолевого маркера СА 15-3 в сыворотке крови
(СА 15-3-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов СА 15-3-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации опухолевого маркера СА 15-3 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. СА 15-3 – представляет собой антигенный эпитоп мембранного муциноподобного гликопротеина MUC1 (молекулярной массой 250 – 1000 кДа), который представлен на апикальной поверхности как малигнизированных, так и нормальных эпителиальных клеток молочной железы, а также легких, яичников, поджелудочной железы, мочевого пузыря и толстого кишечника. В сыворотке крови большинства здоровых женщин концентрация СА 15-3 не превышает 30 Ед/мл.

1.3. Количественное определение содержания СА 15-3 в сыворотке крови может быть использовано для диагностики и мониторинга течения рака молочной железы; контроля эффективности проводимого лечения и раннего выявления рецидивов заболевания.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных, 1 контрольного образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД О.С. Вороновой.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител к СА 15-3 с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит связывание антигена СА 15-3 с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации СА 15-3 в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА 15-3 в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными моноклональными антителами к СА 15-3, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта «Lipocheck Tumor Marker Control» (фирма BioRad, Франция), содержащие известные количества СА 15-3 – 0; 10; 25; 50; 100; 250 Ед/мл; концентрации СА 15-3 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,4 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием СА 15-3, готовый для использования – 1 флакон (0,4 мл);
- конъюгат моноклональных антител к СА 15-3 с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,3 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (10,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Тх25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнкой для заклеивания планшета;

- ванночкой для реагента;
- наконечниками для пипетки на 5 – 200 мкл.
- трафаретом для построения калибровочного графика.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции с другими онкомаркерами: СА-125, СА-19-9, РЭА.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания СА 15-3 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «СА 15-3-ИФА-БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 15-3 в образцах сыворотки крови при разведении их раствором для разведения сывороток имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10 - 250 Ед/мл и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА 15-3 предписанной в образце, полученном путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 25 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 15-3 не превышает 1,5 Ед/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация СА 15-3, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 89 здоровых женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет, не превышала 30 Ед/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации СА 15-3, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. 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.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. 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 при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;

– термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при 400-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, с изменяемым объёмом отбора жидкостей на: 5 – 50 мкл, 50 – 350 мкл;

- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

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 от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца.

Калибровочные образцы и контрольный образец готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Калибровочные и контрольный образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Приготовление рабочего разведения анализируемых образцов сыворотки крови.

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки крови, тщательно перемешать.

Использовать в течение 60 мин после приготовления.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата конъюгата и промывочного раствора не более, чем за 5-10 мин до начала анализа.

Приготовленный рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Промывочный раствор		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий раствор конъюгата	
	ФСБ-Т×25, мл	Дистилли- рованная вода, мл	ТМБ, кон- центрат (мл)	СБР, мл	Конъюгат, концентрат, мл	Промывоч- ный раствор, мл
2	4,0	До 100	0,14	2,0	0,2	2,0
3	6,0	До 150	0,21	3,0	0,3	3,0
4	8,0	До 200	0,28	4,0	0,4	4,0
5	10,0	До 250	0,35	5,0	0,5	5,0
6	12,0	До 300	0,42	6,0	0,6	6,0
7	14,0	До 350	0,49	7,0	0,7	7,0
8	16,0	До 400	0,56	8,0	0,8	8,0
9	18,0	До 450	0,63	9,0	0,9	9,0
10	20,0	До 500	0,70	10,0	1,0	10,0
11	22,0	До 550	0,77	11,0	1,1	11,0
12	24,0	До 600	0,84	12,0	1,2	12,0

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовится в стеклянном флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из субстратного буферного раствора и концентрата тетраметилбензидина не более, чем за 5-10 мин до окончания инкубации.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Допускается хранение рабочего раствора тетраметилбензидина в течение 3 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

7.8. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл каждого калибровочного образца и по 25 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в рабочем разведении (см. п. 7.5).

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15 мин.

7.9. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. п. 7.6).

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

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре от 22 до 28 °С и 650 об/мин.

7.11. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5.

Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.7) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре от 22 до 28 °С и 650 об/мин.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации СА 15-3 в калибровочных образцах (Ед/мл).

9.2. Определить содержание СА 15-3 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов СА 15-3-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, концентрат тетраметилбензидина, субстратный буферный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 не более 3 ч;

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут;
– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации СА 15-3 в контрольном образце.

10.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С не более 3 мес; допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.4. Если концентрация СА 15-3 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 250 Ед/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (10 мкл исследуемого образца в рабочем разведении (разведение 1:10) + 190 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

По вопросам, касающимся качества набора «СА 15-3-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-20-60, 227-75-41, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Ст. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

О.С. Воронова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



Подпись _____
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____

д.м.н., профессор В.В. Долгов
«17» 02 2011г.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
девят листов

Handwritten signature