



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

«Набор реагентов для количественного определения ракового антигена СА-62 в сыворотке крови человека методом иммунохемилюминесцентного анализа (**ИХА-СА-62**) для диагностики in vitro»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ИХА-СА-62» предназначен для количественного определения в сыворотке крови человека карцином-специфичного антигена СА-62 для обнаружения эпителиальных карцином различных локализаций у взрослого населения, независимо от пола и расы. Медицинское изделие «ИХА-СА-62» является вспомогательным методом in vitro диагностики и предназначено для помощи врачу в принятии медицинского решения.

Развитие онкологических заболеваний вызывает появление в организме человека различных раковых антигенов, которые являются результатом измененного генома опухолевой клетки и идентифицируются как «опухолевые маркеры». Одним из таких маркеров является карцином-специфичный антиген СА-62, который экспрессируется в больших количествах на поверхности «малигнизированных» эпителиальных клеток с самого начала роста опухоли [1-4]. История выявления карцином-специфичного антигена СА-62 уходит в 1980-е годы и связана с работами как российских, так и зарубежных исследователей, подробно описанных в статьях [5-13]. Однако, несмотря на столь длительную историю открытия ракового антигена СА-62 – рецептора к АФП, до настоящего времени не было зарегистрировано ни одного диагностического теста на выявление этого высокочувствительного карцином-специфичного гликопротеина, повышенный уровень которого ассоциируется с наличием эпителиальных карцином различных локализаций и может использоваться для выявления процесса канцерогенеза [1-7, 9-11].

Раковый антиген СА-62 с молекулярной массой около 62 кДа представляет собой целое семейство гликопротеинов, которое присоединяет альфа-фетопроtein (АФП) при помощи особой комбинации олигосахаридов, расположенных на поверхности антигена СА-62. Специфические антитела, используемые в сывороточном иммуно-хемилюминесцентном анализе «ИХА-СА-62», узнают на молекулярном уровне онко-специфичный олигосахаридный фрагмент, что позволяет идентифицировать все молекулярные формы ракового антигена. Опухолевые клетки выделяют две основные растворимые цитоплазматические фракции N-гликопротеина в кровь, что позволяет количественно измерять уровень антигена СА-62 в крови пациента [4, 5]. Таким образом, оценка экспрессии маркера эпителиальных карцином СА-62 является вспомогательным средством для диагностики при выявлении эпителиальных карцином и дать дополнительную информацию врачу при постановке диагноза [1-4].

Проведенные ранее исследования показали, что клетки эпителиальных карцином демонстрируют значительную экспрессию гликопротеиновых антигенов СА-62 во всех исследованных локализациях эпителиальных карцином (молочной железы, предстательной железы, легких, матки, желудка, почек, яичников и др.) [1-4]. При этом большинство доброкачественных заболеваний и здоровых образцов не демонстрируют повышенной экспрессии маркера СА-62. Тест успешно прошел многочисленные пилотные клинические исследования в США и Европе, результаты которых получили высокую оценку зарубежных исследователей и клинических онкологов и были опубликованы в [1-4]. Концентрацию СА-62 измеряли в сыворотке крови у здоровых людей Западного региона России, Западной Европы, Западного и Восточного регионов Канады, Западного и Восточного регионов США в возрасте 20-75 лет. Средняя концентрация антигена СА-62 составляет 3500 Ед/мл в интервале 50-10000 Ед/мл. Для определения диагностической чувствительности и специфичности были проанализированы диверсифицированные группы больных и здоровых людей, которые относились к различным расам, включающим европеоидную, негроидную и монголоидную. Статистически значимых отличий между различными расами выявлено не было. Из них были исследованы 380 образцов сыворотки пациентов с верифицированным раком молочной железы, 200 образцов сыворотки пациентов с верифицированным раком яичников, 212 образцов сыворотки пациентов с верифицированным раком предстательной железы и 249 сертифицированных образцов сыворотки здоровых контролей соответствующего возраста и пола. Результаты исследований приведены в Таблицах 1-2.

Таблица 1
Диагностическая чувствительность* теста

Карциномы локализация	Количество верифицированных образцов	Число образцов с истинно положительными результатами ТР	Результаты измерений		Диагностическая чувствительность
			Положительные результаты	Отрицательные результаты	
Молочная железа	380	353	353	27	93%
Предстательная железа	212	170	170	42	85%
Яичники	200	180	180	20	90%

Таблица 2
Диагностическая специфичность* теста

Карциномы локализация	Количество сертифицированных клинических образцов	Число образцов с истинно отрицательными результатами	Результаты измерений ИХА-СА-62		Диагностическая специфичность
			Положительные	Отрицательные	
Молочная железа	120	120	0	120	99,23%
Предстательная железа	24	24	0	24	99%
Яичники	105	105	0	105	99%

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

3. ВИД МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ – 342340.

4. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА – сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ин витро диагностики. Назначение анализа и интерпретация результатов должна осуществляться врачом.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

5.1. Состав набора

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

1. Планшет 96-луночный полистироловый стрипованный черного цвета для люминесценции, с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными IgM-антителами к раковому антигену СА-62, готовый для использования - 1 шт;

2. Конъюгат «СА-62–Акридин» с люминесцентным акридином, требует разведения, указанного в паспорте к медицинскому изделию - 0,1 мл (1 флакон);

3. Калибровочные пробы «Стандартные калибраторы СА-62», на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества СА-62 человека: 50, 250, 650, 1250, 2500, 5000, 7000 и 10000 Ед/мл, готовые для использования – 0,5 мл (8 флаконов);

4. Положительный контрольный образец на основе сыворотки крови с известным содержанием СА-62 (7000-10000 Ед/мл), готовый для использования – 1 мл (1 флакон);

5. Рабочий буферный раствор с Твин-80, готов к использованию – 25 мл (1 флакон);

6. Рабочий раствор А для диспенсера 1 хемилюминометра, готов к использованию – 25 мл (1 флакон);

7. Рабочий раствор Б для диспенсера 2 хемилюминометра, готов к использованию – 25 мл (1 флакон).

Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 48 исследований, включая стандартные калибраторы СА-62, и последующей детекции люминесцентного конъюгата СА-62-Акридин, присоединившегося к специфическим моноклональным антителам анти-СА-62 в результате одностадийного конкурентного иммунохемилюминесцентного анализа ИХА-СА-62, на специализированных для этого приборах флэш-люминометрах.

5.2. Принцип метода

Набор реагентов «ИХА-СА-62» представляет собой одностадийный конкурентный вариант твердофазного иммуно-хемилюминесцентного анализа (ИХА), при котором происходит конкуренция между содержащимся в анализируемом образце карцином-специфичным антигеном СА-62 и люминесцентным конъюгатом СА-62-Акридин за связывание с моноклональными антителами к гликопротеину СА-62, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

Во время 2-х часовой инкубации к иммобилизованным специфическим антителам добавляется раствор, содержащий разбавленный образец сыворотки и фиксированную концентрацию меченого антигена, после чего сорбент отмывается от несвязавшихся компонентов и затем регистрируется люминесцентный сигнал образовавшихся на твердой фазе иммунных комплексов.

Несвязавшиеся компоненты удаляются во время отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс {анти-СА62-МаТ-(СА-62-Акридин)} регистрируется при помощи люминесцентного сигнала импульсным хемилюминетром. Величина регистрируемого люминесцентного сигнала продукта окисления субстрата обратно пропорциональна содержанию ракового антигена СА-62 в анализируемой пробе.

Серия калибровочных проб (Стандартные калибраторы «СА-62») тестируется одновременно с образцами, на основе чего строится калибровочная кривая (Logit-Log кривая) для количественного определения гликопротеина СА-62 в единицах измерения (Ед/мл) в неизвестных образцах.

Положительный контрольный образец СА-62* представляет собой референтную пробу сыворотки крови человека с известным количеством антигена СА-62, растворенным в Рабочем буферном растворе с Твин-80.

**Примечание. Стандартные калибраторы и Положительный контрольный образец СА-62 отконтролированы на отсутствие маркеров ВИЧ (антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1); гепатита В (HBsAg); гепатита С (антитела), Treponema pallidum (антитела) методом ИФА в тест-системах, зарегистрированных в РФ.*

5.3. Метрологическая прослеживаемость

Метрологическая прослеживаемость значений концентрации Стандартных калибраторов, входящих в состав набора реагентов «ИХА-СА-62», изготовленных компанией Angio Medic Inc, Канада, соответствует заявленному. Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации ракового антигена СА-62 референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации при количественном исследовании уровня антигена СА-62 (Ед/мл) в верифицированных клинических образцах.

5.4. Ограничения метода

- 1). Набор реагентов «ИХА-СА-62» предназначен исключительно для *in vitro* диагностики.
- 2). Корректные результаты могут быть получены только в сыворотке крови человека, полученной из венозной крови. Образцы плазмы крови для данного теста не подходят.
- 3). Наличие цитрата, оксалата, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) или других хелатирующих агентов также, как и гепарина в образцах, сделают результаты теста некорректными.
- 4). Образцы от пациентов с беременностью, кормящих, с острыми кровопотерями, постраневым состоянием, состоянием после иммунизации и воспалительным процессом исследованию не подлежат, так как потенциально могут привести к ложноположительным результатам теста.
- 5). Поскольку набор реагентов «ИХА-СА-62» является вспомогательным методом *in vitro* диагностики для помощи врачу в принятии медицинского решения, он не предназначен для тестирования выявленных онкобольных в процессе их лечения.
- 6). Набор реагентов «ИХА-СА-62» необходимо использовать только по назначению врача.
- 7). Влияние интерферирующих веществ таких как сывороточные белки (билирубин, холестерин, гемоглобин, сывороточный альбумин человека, альфа-1, альфа-2-глобулины, бета-глобулины, гамма-глобулины, общие триглицериды) и онкомаркеры (РЭА, СА 125, ПСА, СА 19-9, СА 15-3, АФП) в пределах физиологических норм на результаты измерений уровня маркера СА-62 не обнаружено. Превышение уровня физиологических норм

указанных интерферирующих веществ потенциально могут привести к ложноположительным результатам теста:

п/п №	Исследуемое Вещество	Нормальные значения	Диапазон, при котором не оказывается влияние
1	Билирубин	менее 12 мг/л (< 21 мкмоль/л)	От 0 до 14,6 мг/л (25 мкмоль/л)
2	Холестерин	менее 2 г/л (< 5,18 ммоль/л)	От 0 до 2,7 г/л (7 ммоль/л)
3	Гемоглобин	117 -160 г/л (7,2 – 9,93 ммоль/л)	От 0 до 180 г/л (11,2 ммоль/л)
4	Сывороточный альбумин человека (ЧСА)	35,0 -54,8 г/л (532 – 833 мкмоль/л)	От 35,5 до 86,8 г/л (540 – 1319 мкмоль/л)
5	Альфа-1-глобулины	1,3 – 4,2 г/л (43 – 140 мкмоль/л)	От 1,4 до 17 г/л (46,7 – 567 мкмоль/л)
6	Альфа-2-глобулины	3,9 - 8,5 г/л (130 -283 мкмоль/л)	От 4,7 до 63 г/л (156,7 -2100 мкмоль/л)
7	Бета-глобулины	4,0 – 12,5 г/л (0,34 – 1,06 ммоль/л)	От 4,7 до 60 г/л (0,4 -5,1 ммоль/л)
8	Общие Триглицериды	менее 1,5 г/л (< 1,7 ммоль/л)	От 0 до 2,5 г/л (2,8 ммоль/л)
9	Гамма-глобулины	7,3 – 13,5 г/л (76,8 – 142 мкмоль/л)	От 8,2 до 50 г/л (40 – 526 мкмоль/л)
10	РЭА, раковый эмбриональный антиген	0 – 4,8 мМЕ/мл (0 - 3,8 нг/мл)	От 0 до 220 мМЕ/мл (0 -20 нг/мл)
11	СА 125, Раковый антиген	0 – 35 Ед/мл	От 0 до 150 Ед/мл
12	ПСА, простат-специфический антиген	0 – 4 нг/мл	От 0 до 80 нг/мл
13	СА 19-9, Раковый антиген	0 – 24 Ед/мл	От 0 до 100 Ед/мл
14	СА 15-3, Раковый антиген	0 – 30 Ед/мл	От 0 до 150 Ед/мл
15	АФП, Альфа-фетопротеин	0 – 12 МЕ/мл (0 - 15 нг/мл)	От 0 – 50 МЕ/мл (0 – 62,5 нг/мл)

8). Результаты анализа для пациентов с карциномами IV стадии статистически могут проявлять повышенную вероятность получения ложноотрицательных результатов. Врач при оценке результатов анализа должен учитывать анамнез и общее состояние пациента.

9). При оценке результатов теста врач должен руководствоваться анамнезом и статистическим распределением уровня маркера у здоровых и больных, поскольку часть здоровых людей и пациентов с доброкачественными опухолями могут демонстрировать повышенный уровень экспрессии маркера СА-62 (на данной стадии исследований неизвестно, не находятся ли отдельные доброкачественные новообразования в процессе перехода в злокачественные).

10). Образцы сыворотки, демонстрирующие повышенную липемию, сильный гемолиз или турбулентность, не должны использоваться для данного теста. Такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию.

6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется использованием мышиных моноклональных антител к раковому антигену СА-62, что исключает перекрестные реакции специфических антител анти-СА-62 МаТ с сывороточным альбумином и иммуноглобулинами человека.

Аналитическая специфичность набора реагентов «ИХА-СА-62», т.е. способность выявлять только карцином-специфичный антиген СА-62, вне зависимости от присутствия в анализируемом образце других антигенов, белков и иммуноглобулинов человека, была доказана производителем при исследовании культуры клеток различных видов рака - MCF-7, T47D, Her G2, HeLa, SW-620, K-562, а также при изучении сыворотки крови пациентов, больных раком молочной железы, раком предстательной железы или раком яичников. Ложноположительные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как соотношение истинноотрицательных результатов к общему количеству отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

6.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность - в соответствии с разделом 5.4.1.7 ГОСТ Р 51352-2013, ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 п. А.2.7, наименьшая величина, которая может быть обнаружена с достаточной уверенностью. Нормативные технические требования - чувствительность не превышает 35 Ед/мл с достоверностью 0,95. Обоснование выбора «нулевой калибровочной пробы» $B_0 = 50$ Ед/мл: так как используемый иммунотест предполагает конкурентное связывание, то линейная зависимость между концентрацией и относительными световыми единицами (RLU) может быть получена исключительно в логарифмических координатах, что приводит к тому, что измерения, полученные для нулевых концентраций, не отображаются на осях координат. Для целей измерения аналита важен диапазон концентраций маркера СА-62 от 1250 до 10000 Ед/мл. Соответственно, при выборе минимальной концентрации для "нулевой пробы" необходимо исходить из того, что на графике «нулевая проба» должна находиться на той же прямой, которая получается при построении линейного диапазона концентраций 1250 – 10000 Ед/мл. Только в этом случае эффекты «нелинейности» крайних значений оказывают минимальное влияние на определение величины маркера СА-62. Таким образом, была выявлена концентрация «нулевой калибровочной пробы», находящаяся в диапазоне 49-51 Ед/мл из диапазона проб 650, 250, 50, 25 и 10 Ед/мл, три из которых, 50 и 250 и 650 Ед/мл были включены в набор реагентов «ИХА-СА-62».

6.3 Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения концентрации СА-62 в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 10% по результатам внутри- и межсерийных измерений Положительного контроля и контрольных образцов.

6.4. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации СА-62, предписанной в образце, полученном при смешивании равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5000 Ед/мл СА-62. Процент «открытия» составляет 90-110%. Для изучения внутрисерийной и внутрилабораторной прецизионности производителем были проведены внутрилабораторные испытания с учетом вариаций как внутри одной серии, так и между различными сериями в разное время. Межлабораторные испытания прецизионности были

проведены в рамках клинических испытаний. Результаты проведенных испытаний прецизионности показали соответствие измеренного процента «открытия» нормальному диапазону измерений. Проведенный регрессионный анализ двух независимых измерений, проведенных в лаборатории производителя и в испытательной лаборатории, подтвердил наличие межлабораторной прецизионности с коэффициентом корреляции (детерминации) $r^2 = 0,99$.

6.5. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения при детекции образцов с концентрациями СА-62 от 1250 до 10000 Ед/мл процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

6.6. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями уровня СА-62 и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Тест на “линейность” для логарифмической функции (функция Logit-log) - отклонение от расчетной величины логарифма концентрации СА-62 при пяти последовательных двукратных разведениях выбранных калибровочных проб. При этом, Стандартный калибратор «СА-62, 10000 Ед/мл», Стандартный калибратор «СА-62, 5000 Ед/мл» и Стандартный калибратор «СА-62, 1250 Ед/мл» последовательно разводятся в 2, 4, 8, 16 и 32 раза. Таким образом, диапазон линейности составляет от 10000 до 1250 Ед/мл СА-62.

7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Для определения диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов «ИХА-СА-62» в рамках клинических испытаний набора реагентов «ИХА-СА-62» были проанализированы 300 образцов сыворотки, включая 58 образцов сыворотки крови от больных с верифицированным колоректальным раком, 25 образцов сыворотки от больных раком молочной железы, 32 образца сыворотки от больных раком легкого, 35 образцов сыворотки пациентов с верифицированным раком предстательной железы и 150 верифицированных образцов сыворотки здоровых контролей соответствующего возраста и пола.

7.1. Клиническая (диагностическая) чувствительность

Клиническая (диагностическая) чувствительность определялась как доля, выраженная в процентах, истинно положительных результатов, подтвержденных гистологическими исследованиями образцов, в группе больных. Для расчета «истинного» значения клинической (диагностической) чувствительности использовалась формула в соответствии с ГОСТ Р 53022.3—2008 (Таблица 4, Раздел 5.5) и ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 (Раздел А.3.15):

$$\text{Sens\%} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}), \text{ где}$$

TP - истинноположительный результат анализа, подтвержденный гистологически,
FN – ложноотрицательный результат анализа, подтвержденный гистологически.

Таким образом, «истинное» значение диагностической чувствительности при 95% специфичности составило 93,7 % (см. Таблицу 3).

Для расчета интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности и специфичности с доверительной вероятностью $C=95\%$, то есть для определения показателя правильности исследований, использовалась формула в

соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008 и теорией вероятности для независимых испытаний по распределению Бернулли*:

$$D\% = D_0\% \pm 1.96 * [D_0\% * (100 - D_0\%) / n]^{(1/2)}$$

где $D_0\%$ - целевое значение величины относительного смещения;

$D\%$ - целевое значение коэффициента общей аналитической вариации;

1,96 - квантиль стандартного нормального распределения для уровня значимости 0,05.

*Распределение Бернулли в теории вероятностей и математической статистике – дискретное распределение вероятностей, моделирующее случайный эксперимент произвольной природы, при известной вероятности успеха или неудачи. Положинцев Б.И. Теория вероятностей и математическая статистика. Введение в математическую статистику: Учебное пособие. - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. - 95 с.

Интервал, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C=95\%$, составил 89,8-97,6%

7.2. Клиническая (диагностическая) специфичность

Клиническая (диагностическая) специфичность лабораторного теста определялась как доля, выраженная в процентах, истинно отрицательных образцов сыворотки здоровых людей, имеющих подтвержденное отсутствие онкологических заболеваний, к группе здоровых. Для расчета «истинного» значения клинической (диагностической) специфичности использовалась формула в соответствии с ГОСТ Р 53022.3—2008 (Таблица 4, Раздел 5.5) и ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 (Раздел А.3.16):

$$Sp\% = TN / (TN + FP), \text{ где}$$

TN – истинно отрицательный результат анализа,

FP – ложно положительный результат анализа.

Таким образом, «истинное» значение диагностической специфичности составило 98,7 % (см. Таблицу 3). Интервал, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C=95\%$, составил 96,9-100,0%

Таблица 3

Критерий	Карцинома различных локализаций	Здоровые контроли
Общее количество образцов $N = 300$	$N = 150$	$N = 150$
Положительный результат	Истинно положительный (TP) $N = 140$	Ложно положительный (FP) $N = 2$
Отрицательный результат	Ложно отрицательный (FN) $N = 10$	Истинно отрицательный (TN) $N = 148$
Диагностическая чувствительность, (Sensitivity)	93,7% доля истинно положительных результатов в группе	Диапазон с 95% ДИ

Диагностическая специфичность, (Specificity)	Доля истинно отрицательных результатов в группе	98,7%
Предсказательная ценность положительного результата PPV Доля истинно положительных результатов среди всех положительных результатов	$98,5\% (TP/TP+FP)*100\%$	
Предсказательная ценность отрицательного результата NPV	$93,7\% (TN/TN+FN)*100\%$	
Диагностическая эффективность теста % Доля истинных результатов среди всех результатов теста	$96\% (TP+TN)/(TP+FN+TN+FP)*100\%$	

7.3. Корреляция результатов

Корреляция результатов дубликатов измерения концентрации ракового антигена СА-62, проведенных на 792 клинических образцах (сыворотки пациентов с верифицированным раком молочной железы, сыворотки пациентов с верифицированным раком яичников, сыворотки пациентов с верифицированным раком предстательной железы и 249 сертифицированных образцов сыворотки здоровых людей) набором реагентов «ИХА-СА-62» составляет не менее **0,9**.

8. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

8.1. Требования безопасности при работе с набором

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- При работе с исследуемыми образцами в наборе реагентов «ИХА-СА-62» следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфицированным материалом, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и «ИНСТРУКЦИИ ПО МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ РАБОТЕ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. Стандартные калибраторы содержат компоненты человеческой крови и должны быть использованы и утилизированы в соответствии с требованиями, необходимыми для работы с биологическими и потенциально инфицированными образцами. Использовать эти реагенты и образцы крови пациентов необходимо в соответствии с установленной в мире надлежащей лабораторной практикой (GLP). Никогда не следует забирать реагенты при помощи рта и избегать контакта кожи или слизистой оболочки с реагентами и образцами.
- Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии с МУ-287-113 «МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ДЕЗИНФЕКЦИИ, ПРЕДСТЕРИЛИЗАЦИОННОЙ ОЧИСТКЕ И СТЕРИЛИЗАЦИИ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ» (УТВ. ДЕПАРТАМЕНТОМ ГОССАНЭПИДНАДЗОРА Минздрава РФ ОТ 30.12.1998). Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Стандартные калибраторы, конъюгат и Положительный контрольный образец

содержат Мертиолят (орто-этилртутьтиосалицилат натрия, $C_9H_9HgO_2SN_9$, MW 404.8, CAS: 54-64-8), который обладает противомикробной активностью и широко используется во всем мире для предотвращения роста бактерий и фунгицидов в биологических образцах. Используемая итоговая концентрация Мертиолята 0,02% в стандартных калибраторах, конъюгате и в исследуемых образцах тест-системы «СА-62», необходимая для предотвращения микробного роста в биологических образцах, является нетоксичной.

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности.
- Образцы сыворотки, демонстрирующие повышенную липемию, сильный гемолиз или турбулентность, не должны использоваться для данного теста. Оптимальные результаты теста будут получены при строгом соблюдении этого протокола. Необходимо проводить аккуратное и точное пипетирование, без пенообразования образцов и компонентов набора реагентов также, как и следование точному временному и температурному режиму, описанному в протоколе. Какие-либо отклонения от инструкций могут давать ошибочные результаты!
- Не использовать набор по истечении срока годности.

8.2 Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависит от выполнения следующих основных правил:

- Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИХА; например, не следует использовать щелочные растворы, а также четвертичные аммониевые соли, спирты и третичные амины;

- Следует избегать загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого необходимо использовать в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого контроля, реагента и для каждого из дубликатов образца;

- Рабочие поверхности столов, пипетные дозаторы и оборудование следует обрабатывать 70% этиловым или изопропиловым спиртом.

- Тестируемые образцы должны быть подготовлены для проведения теста в соответствии с рекомендациями в разделе 4;

- При допущении ошибки во время внесения анализируемых образцов, нельзя, опорожнив лунку, вносить в нее новый образец: такая лунка бракуется!

8.3 Промывка микропланшетов

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для промывки микропланшета рекомендуется использовать автоматический промыватель микропланшетов или ручное промывочное устройство.

- Не следует допускать полного высыхания лунок планшета между завершением

промывки и внесением реагентов.

- Необходимо добиваться полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к искажению результатов анализа.

- Необходимо следить за состоянием автоматического промывателя микропланшетов, для чего следует еженедельно обрабатывать шланги и емкости промывателя 70% этиловым или изопропиловым спиртом.

- Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой и еженедельно следует проводить процедуру промывки 70% раствором этилового или изопропилового спирта и последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой.

8.4. Требования охраны окружающей среды

8.4.1. Набор реагентов «ИХА-СА-62» не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности, в том числе, и в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

8.4.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

8.4.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

8.4.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

8.4.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

9. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы, не поставляемые с набором реагентов:

- Микропланшетный импульсный (флэш) люминометр типа Anthos Lucy 2 (Biochrom Ltd, 22 Cambridge, CB4 0FJ, UK, Великобритания, РУ на МИ от 05.11.2008 № ФСЗ 2008/02880) или аналогичный, имеющий один или два инжектора, для считывания люминесцентного сигнала в лунках, вызванного реакцией окисления люминофора. Для считывания люминесцентного сигнала не требуется дополнительного фильтра в приборе;

- Баня-термостат водяная с температурным диапазоном от +5 до +100°C;
- Автоматический промыватель планшетов;
- Вортекс лабораторный;
- Холодильник с морозильной камерой (температурный режим от минус 20 до минус 35 °C);

- Центрифуга медицинская лабораторная;
- Дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 2 до 1000 мкл;
- Наконечники для дозаторов объемом 0,5-10 мкл, 50-200 мкл и 100 1000 мкл;
- Ванночки для буферных растворов;
- Таймер лабораторный;
- Перчатки нитриловые одноразовые медицинские;
- Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом не менее 10 мл.
- Вода дистиллированная;

10. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

10.1. Материал для исследования

Материалом для исследования набором реагентов «ИХА-СА-62» является негемолизированная сыворотка крови человека.

10.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Для получения сыворотки крови, используемой при клинико-химических или серологических исследованиях, делают забор венозной крови в вакуумные пробирки без антикоагулянтов, в соответствии со стандартом ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.

- Сразу после забора крови перевернуть вакуумную пробирку 5 раз и оставить в вертикальном положении при комнатной температуре до полного сворачивания крови в течение часа.

- Центрифугировать вакуумные пробирки со свернувшейся кровью следует в течение 10 мин при 3000-3500 об/мин (ускорение 1000-1200 g).

- Перенести 1 мл сыворотки в криопробирку с завинчивающейся крышкой, плотно закрыть крышку контейнера до использования образца.

- Следует избегать многократных циклов замораживания и оттаивания образцов.

- На один анализ в дубликate потребуется 20 мкл сыворотки одного пациента.

11. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа необходимо вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при комнатной температуре от плюс 22 до плюс 25 °С не менее одного часа.

При детальном использовании набора после отбора части содержимого флаконы и оставшиеся стрипы планшета следует немедленно плотно закрыть, поместить в холодильник и хранить при температуре от минус 20 до минус 30 °С в пределах срока годности набора.

Стандартные калибраторы, планшет с иммобилизованными антителами и рабочий буферный раствор с Твин-80 готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. Конъюгат набора реагентов «ИХА-СА-62» требует разбавления, указанного на этикетке, для получения разбавленного раствора с использованием рабочего буферного раствора с Твин-80. Точное разведение конъюгата указано на этикетке каждой партии конъюгатов «СА-62-Акридин» и паспорте на серию набора реагентов. Разбавленный раствор конъюгата необходимо использовать в течение часа во избежание потери люминесцентного сигнала. Рекомендуется разбавлять рабочий раствор конъюгата в

центрифужной пробирке с закручивающейся крышкой типа Фалкон, обернутой фольгой.

Пробирки со стандартными калибраторами набор реагентов «ИХА-СА-62» необходимо аккуратно перемешать на вортексе без вспенивания раствора для полного перемешивания. **Не допускается образования пены при пипетировании! Необходимо использовать отдельный наконечник для каждого калибратора.**

При желании в тесте можно использовать Положительный контрольный образец СА-62, который не является обязательным к использованию при проведении теста и предназначен лишь для возможности контроля работы тест-набора при его хранении. При использовании Положительного контроля СА-62 его вносят в лунки планшета в объеме 50 мкл/лунку. Положительный контрольный образец СА-62 должен храниться в замороженном виде при температуре ниже минус 20 °С в течение всего срока годности набора (3 месяца с даты приготовления).

11.1 Подготовка планшета

Вскрыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов для проведения анализа. Планшет с иммобилизованными антителами уже готов к использованию. Неиспользованные стрипы немедленно поместить в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть и поместить в морозильник при температуре от минус 20 до минус 30°С. Хранить при температуре от минус 20 до минус 30°С в течение всего срока годности (3 месяца с даты приготовления).

11.2 Приготовление рабочего буферного раствора

Рабочий буферный раствор с Твин-80, готов к использованию и не требует дальнейшего разбавления. Необходимо разморозить флакон с рабочим буферным раствором, довести его до комнатной температуры, аккуратно перемешать на вортексе и перелить необходимое количество раствора в ванночку для буферных растворов и пробирку типа Фалкон. Рабочий буферный раствор содержит высокую концентрацию Твин-80, что вызывает пенообразование раствора в пределах нормы. Остатки буферного раствора после использования необходимо утилизировать. **Не допускается сливать остатки буферного раствора во флакон с исходным раствором.**

11.3 Подготовка конъюгата «СА-62–Акридин»

Конъюгат «СА-62–Акридин» представляет собой концентрированный раствор меченого люминесцентным акридином ракового антигена в фосфатно-солевом буферном растворе, который необходимо разбавить в Рабочем буферном растворе с Твин-80 до указанной на этикетке конъюгата концентрации (или указанной в паспорте на серию) для получения разбавленного раствора конъюгата.

11.4 Подготовка анализируемых образцов и их хранение

Для корректного выполнения анализа с использованием набора реагентов «ИХА-СА-62» все анализируемые образцы должны пройти предварительную пробоподготовку, которая заключается в термообработке всех образцов на водяной бане при 56°С в течение 30 минут (при объемах образца 0,5 мл – 1 мл). **Несоблюдение этой процедуры изменит результаты теста!**

Образцы с консервантом могут храниться в течение 3-х недель при плюс 4 °С до их использования. В случае более длительного хранения образцы должны быть заморожены при минус 20 °С или минус 80°С, по мере возможности.

Разведение анализируемых образцов 1:10 производится в самих лунках планшета при смешении 10 мкл образца с 40 мкл рабочего буферного раствора и последующего добавления к смеси 50 мкл разбавленного раствора конъюгата «СА-62–Акридин».

12. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Все реагенты, стандартные калибраторы и образцы необходимо довести до комнатной температуры перед выполнением теста и тщательно перемешать перед их использованием. Стандартные калибраторы и тестируемые образцы обрабатываются единообразно и должны тестироваться в дубликатах.

Внимание: Разбавленные образцы и рабочий раствор конъюгата «СА-62–Акридин» должны быть свежеприготовленными. Не следует использовать заранее разбавленные и хранящиеся материалы, поскольку это может изменить результаты измерений теста.

1. Используйте необходимое количество стрипов из разборных планшетов с иммобилизованными антителами к СА-62 для выполнения анализа.
2. Внесите по 50 мкл стандартных калибраторов СА-62 в лунки А-Н в дубликатах.
3. С использованием одноканального дозатора с переменным объемом внесите по 10 мкл каждого анализируемого образца* в две соседние пустые лунки (дубликаты) с иммобилизованными антителами. **ВНОСИТЕ КАПЛЮ СЫВОРОТКИ В ЛЕВУЮ ЧАСТЬ ДНА ЛУНКИ, ПРИ ЭТОМ КАЖДЫЙ РАЗ МЕНЯЯ НАКОНЕЧНИК. Время внесения образцов не должно превышать 30 минут при использовании всех лунок планшета.**
4. Используя 8-канальный дозатор, внесите в лунки планшета по 40 мкл рабочего буферного раствора с Твин-80 для промежуточного разбавления образцов: это предотвратит их высыхание.
5. Тщательно перемешайте образцы в лунках при помощи постепенного похлопывания разных сторон микропланшета.

Разведите конъюгат «СА-62–Акридин» в соответствии с указанным фактором разбавления для получения разбавленного раствора конъюгата с рабочей концентрацией X мкг/мл с использованием пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом не менее 10 мл. На целый планшет необходимо приготовить 6 мл разбавленного раствора конъюгата в буферном растворе с Твин-80. Аккуратно смешайте полученный разбавленный раствор конъюгата при помощи вортекса, избегая сильного вспенивания раствора. Затем при помощи 8-канального дозатора внесите по 50 мкл разбавленного раствора конъюгата «СА-62–Акридин» во все лунки (итоговая концентрация конъюгата в лунках при этом составит $X/2$ мкг/мл). Тщательно смешайте реакционную смесь при помощи постепенного похлопывания разных сторон микропланшета.

6. Закройте микропланшет защитной пленкой и выдерживайте в защищенном от света месте при комнатной температуре (от плюс 22 до плюс 25°C) в течение 2-х часов.
7. Вылейте или аспирируйте содержимое лунок и промойте планшет 6 раз дистиллированной водой с использованием микропланшетного вошера или промывочной бутылки, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок стрипа. В каждую лунку вносите по 270 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки переверните планшет на адсорбирующую бумагу или медицинскую салфетку для удаления излишков жидкости.
8. Для регистрации данных эксперимента установите в люминометре «пустой» фильтр («<-->», «blank») для регистрации данных.

* Положительный контрольный образец «СА-62» не требует предварительного разбавления и вносится в лунку микропланшета в объеме 50 мкл, с последующим добавлением разбавленного раствора конъюгата «СА-62–Акридин».

13. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

13.1. Детекция результатов

Детекция люминесцентного сигнала в лунках, вызванного реакцией окисления люминофора осуществляется на микропланшетном импульсном (флэш)- люминометре типа

Anthos Lucy 2 (Biochrom Ltd, 22 Cambridge, CB4 0FJ, UK, Великобритания, РУ на МИ от 05.11.2008 № ФСЗ 2008/02880) или аналогичного, имеющего один или два инжектора.

- При проведении эксперимента на люминометре с ОДНИМ инжектором.

При помощи ручного мультиканального дозатора добавляется Рабочий раствор А для инжектора 1 хемилюминометра по 50 мкл в каждую лунку микропланшета, после чего микропланшет устанавливается в прибор для считывания результатов. Инжектор люминометра должен диспенсировать по 50 мкл в лунку Рабочего раствора Б для инжектора 2 хемилюминометра и считывать результаты лунки в течение 0,25-1 секунды. Время интеграции должно быть установлено в соответствии с чувствительностью люминометра. Для люминометра Anthos Lucy 2 рекомендуемое время считывания – 1 секунда.

- Проведения эксперимента на люминометрах с ДВУМЯ инжекторами.

На приборе устанавливается объем диспенсирования инжектора 1 на 50 мкл в каждую лунку Рабочего раствора А для инжектора 1 хемилюминометра, а объем диспенсирования инжектора 2 - на 50 мкл рабочего раствора Б для инжектора 2 хемилюминометра. Время ожидания между диспенсированием инжекторов 1 и 2 устанавливается на 0,5 секунд. Считывание результатов должно быть выполнено в течение 1 секунды после окончания диспенсирования второго инжектора.

После этого прибор считывает и регистрирует относительные единицы света (RLU). Для каждой лунки микропланшета. Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов «ИХА-СА-62», представлены в таблице 4 на примере прибора (флэш)- люминометре типа Anthos Lucy 2 (Biochrom Ltd, 22 Cambridge, CB4 0FJ, UK, Великобритания, РУ на МИ от 05.11.2008 № ФСЗ 2008/02880).

Таблица 4

Люминофор	Диспенсер 1 Рабочий раствор А для инжектора 1 хемилюминометра	Диспенсер 2 Рабочий раствор Б для инжектора 2 хемилюминометра	Время ожидания	Считывание результатов
NHS эфир Акридина	50 мкл	50 мкл	0,5 с	1 с

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления люминесцентного сигнала с базовой линией.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора. Требования к прибору обозначены в Таблице 5.

Таблица 5

№	Требования	Описание
1	Тип измерения	Импульсная хемилюминесценция (Flash Luminescence)
2	Режим измерения	Последовательные измерения каждой лунки после инъекции активатора
3	Наличие инжекторов реактивов	Обязательное наличие одного или двух инжекторов, способных дозировать по 50 мкл раствора. В случае наличия только одного инжектора Рабочий раствор А для инжектора 1 хемилюминометра добавляется в лунки микропланшета вручную, а раствор активатора люминесцентного сигнала рабочий раствор Б для

		инжектора 2 хемиллюминометра добавляется инжектором прибора.
4	Детектор	ФЭУ или ксеноновая импульсная лампа
5	Спектральный диапазон люминометрических измерений	От 300 до 700 нм
6	Динамический диапазон	0,001 - 100 000 000 ALU
7	Эмиссионные фильтры	Наличие эмиссионных фильтров с диапазоном длин волн 400-500 нм. Для считывания люминесцентного сигнала допустимо отсутствие эмиссионного фильтра.
8	Оптический путь	Регистрирование относительных единиц света (RLU) сверху лунки после добавления активатора
9	Чувствительность	$\leq 50 \text{ amol ATP}$
10	Динамический интервал	> 6 порядков
11	ПО	Многопользовательское программное обеспечение для управления прибором (ADAP Software) и многопользовательское программное обеспечение для обработки результатов (Microsoft Excel) или аналогичное
12	Планшеты	96-луночные планшеты для люминесценции белого или черного цвета

13.2. Интерпретация результатов

Анализ полученных ранее данных по исследованию пациентов с различными онкологическими заболеваниями [1, 2, 7-11] показал, что значительное повышение уровня онкоспецифического гликопротеина СА-62 в крови пациентов, по сравнению с нормальным уровнем этого антигена в сыворотке здоровых людей, напрямую связано с развитием канцерогенеза. Пороговое значение СА-62 составляет 5000 Ед/мл, при этом референтный диапазон (интервал), отражающий нижнюю и верхнюю границу нормы лабораторного показателя СА-62, составляет 50– 5000 Ед/мл. Таким образом, результаты, выходящие за пределы референтных значений маркера и превышающие пороговое значение в 5000 Ед/мл, могут служить достаточным основанием для поиска причин необычной экспрессии ракового антигена СА-62, который может сигнализировать о возможном патологическом процессе.

13.3. Расчет концентрации гликопротеина СА-62 в анализируемом образце

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения СА-62 для которых лежат в указанном диапазоне линейности.

Калибровочная кривая представляет собой логарифмическую функцию с отрицательным наклоном (то есть чем ниже единицы измерения, тем больше единицы СА-62). С помощью программы Microsoft Excel рассчитываются величины СА-62 образцов следующим образом:

1. Рассчитывается среднеарифметическая величина RLU для каждого Стандартного калибратора и для каждого образца сыворотки (дубликаты).

2. Строится калибровочная кривая: по оси у откладываются измеренные величины RLU Стандартных калибраторов СА-62, по оси x - величина измерения калибраторов в единицах Ед/мл. Необходимо изменить формат горизонтальной оси на логарифмическую шкалу нажатием на правую клавишу мыши. Уравнение логарифмической функции

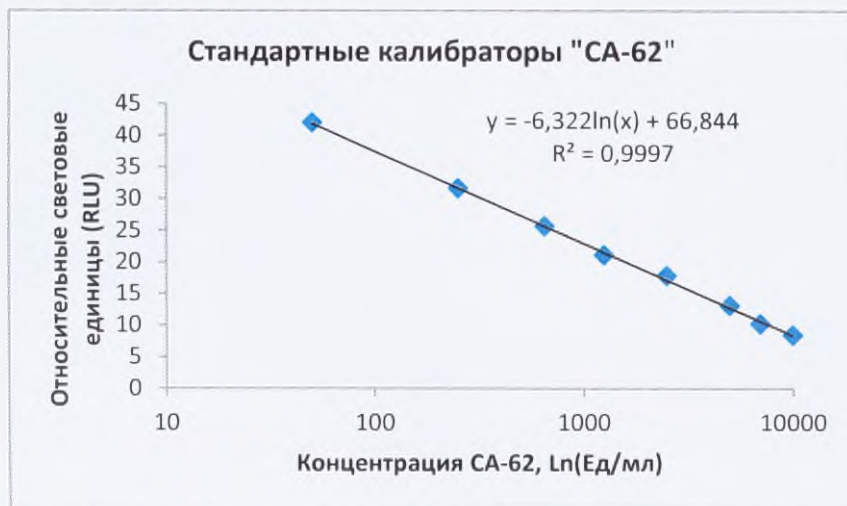
определяется в соответствии с графиком. Величина коэффициента детерминации r^2 не должна быть менее 0.9, в противном случае, необходимо будет повторить измерения для всего ряда образцов.

3. Для интерполяции единиц измерения гликопротеина СА-62 (Ед/мл) используются коэффициенты логарифмического уравнения $y = a \cdot \ln(x) + b$, в котором a и b являются коэффициентами в формуле, рассчитанной по Excel (см. Рис. 1, $a = -6,322$ и $b = 66,844$). Необходимо решить уравнение и определить величину x для каждого индивидуального образца, используя измеренные величины y , что осуществляется расчетами с использованием следующего уравнения: $=EXP((RLU - b) / a)$. Необходимо помнить, что коэффициент « a » будет отрицательным числом.

4.Анализируемые образцы с величинами RLU, попадающими вне шкалы стандартной кривой, не должны быть экстраполированы на эту кривую. Вместо этого, результаты измерений должны быть указаны как > 10000 Ед/мл или < 50 Ед/мл единиц измерения самого большого и самого низкого калибровочного стандарта ракового антигена СА-62.

5.Анализируемые образцы с величинами единиц СА-62, превышающими самый большой калибратор, могут быть соответственно разбавлены Рабочим буферным раствором с Твин-80, после чего точная концентрация определяется при умножении на фактор разбавления.

Рис. 1 Калибровочная кривая



14. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

14.1. Условия хранения

Набор реагентов «ИХА-СА-62» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя в замороженном виде при температуре от минус 20 до минус 30 °С в течение всего срока годности (3 месяца). Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

Дробное использование набора может быть реализовано в пределах срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

14.2. Транспортирование

Набор реагентов «ИХА-СА-62» транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств в замороженном виде в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток с термолонтролем.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

15. УСЛОВИЯ УТИЛИЗАЦИИ НАБОРА

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клиничко-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически-опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) /обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/ обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

Производитель теста гарантирует качество, безопасность и эффективность продукта при условии выполнения требований к условиям хранения, транспортирования и применения теста в соответствии с прилагаемыми инструкциями, при тестировании образцов сыворотки. Какие-либо отклонения от рекомендаций теста могут дисквалифицировать его результат.

17. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

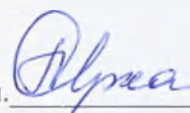
По вопросам, касающимся качества набора реагентов «ИХА-СА-62», следует обращаться в ООО «ДЖЕЙВИС ДИАГНОСТИКС» по адресу: 143026, г. Москва, ИЦ СКОЛКОВО, Б. Бульвар 42, стр.1, помещ. 503; телефон/факс: +7(985)6135431, или e-mail: info@oncomarker.ru

18. ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ricardo Moro, Janneta Gulyaeva-Tcherkassova, Petra Stieber. *Increased AFP-Receptor (RECAF) values in the serum of patients with early stages of breast cancer*. Journal of Current Oncology 2012, Vol. 19, N. 1, P. 1-8.
2. Janneta Tcherkassova, Carolina Abramovich, Rafael Moro, Chen Chen, Ralph Smit, Angela Gerber, Ricardo Moro. *Combination of CA125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer*. Tumor Biol 2011, Vol. 32, No. 4, P. 831-838.
3. Moro R., Tcherkassova J., Song E., Shen G., Moro R., Schmid R., Hu X., Kummer A., Chen C., A new broad-spectrum cancer marker. In-Vitro Diagnostic Technology, 2005, N5, P.1-6.
4. Dowell B., Frost S., Tcherkassova J., Gerber A., Moro R., and Moro R. *Development of a Chemiluminescent Assay (CIA) for the Receptor of Alpha Fetoprotein (RECAF) to Separate Cancer from Normal Sera*, XXXVth Congress of the International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine, September 15 – 19, 2007, Prague, Czech Republic
5. Moro, R., et al., *Monoclonal antibodies directed against a widespread oncofetal antigen: the alpha-fetoprotein receptor*. Tumor Biol, 1993. 14(2): P. 116-130.
6. Трещалина Е.М., Смирнова Г.Б., Цуркан С.А., Черкасова Ж.Р., Лесная Н.А. Роль рецептора альфа-

- фетопропротеина в разработке таргетных препаратов в онкологии. Российский онкологический журнал. 2017; 22 (1), С. 4-14.
7. Janneta Tcherkassova, Sergei Tsurkan, Galina Smirnova, Julia Borisova, Ricardo Moro and Helen Treshalina. Binding characterization of the targeting drug AIMPILA to AFP receptors in human tumor xenographs. Tumor Biology 2017 online access P. 1–11. DOI: 10.1177/1010428317734815 journals.sagepub.com/home/tub.
 8. Молдогазиева Н. Т., Терентьев А. А. Альфа-фетопропротеин и факторы роста. Структурно-функциональные взаимоотношения и аналогии. Успехи биол. химии, 2006, Т. 46, С. 99 -148.
 9. Смирнова Г.Б., Цуркан С.А., Борисова Ю.А., Черкасова Ж.Р., Романенко В.И., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Чувствительность in vivo опухолей человека с различной экспрессией рецептора RECAF к АФП-содержащему комплексу АИМПИЛА. Российский онкологический журнал. 2017. Т. 22. № 5. С. 288-291.
 10. Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Трещалина Е.М. Специфичность связывания препарата АИМПИЛА с рецепторами α -Фетопропротеина на поверхности опухоли человека Т47D из коллекции РОНЦ им. Н.Н. БЛОХИНА. Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С. 117.
 11. Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Трещалина Е.М. Экспрессия рецепторов к α -Фетопропротеину в гомогенатах опухолей человека SW620, Т47D и в культуре клеток HEPG2 из коллекции РОНЦ им. Н.Н. БЛОХИНА. Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С. 116-117.
 12. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А., Малютина Н.Н., Орлов О.А. Альфа-фетопропротеин. Монография, Рос. акад. наук, Ур. отд-ние, Ин-т иммунологии и физиологии УрО РАН, Перм. гос. мед. акад. МЗ РФ, ЗАО "Ин-т новых мед. технологий" ; [отв. ред. Н. Н. Кеворков]. Екатеринбург, 2004,-376с., ISBN 5-7691-1498-3.
http://www.biomedservice.ru/preparat/libr_alfetin3.pdf
 13. Абелев Г.И. Дифференцировочные антигены гемобластозов и эпителиальных опухолей: связь с механизмами трансформации и прогрессии. Онтогенез. 2006.Т. 37. № 3. С.227-23

Рук. производственно-технического центра
ООО «ДЖЕЙВИС ДИАГНОСТИКС, к.фарм.н.

 Цуркан С.А.

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор ООО
«ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

 Варнавичус П.К.

04 МАР 2020



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 19 ЛИСТОВ

« 04 МАР 2020 » 201__ год



Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

пронумеровано и прошнуровано
19 листа(ов)

Генеральный директор
ООО «ДЖЕЙВИС ДИАГНОСТИКС»



Черкасова Ж.Р.

Дата: 14.02.2020

прошнуровано и пронумеровано

_____ листа(ов)

Генеральный директор

ООО «ДЖЕЙВИС ДИАГНОСТИКС»

_____ Черкасова Ж.Р.

Дата: _____

НАБОР РЕАГЕНТОВ «ИХА-СА-62»

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ «ИХА-СА-62»

Набор реагентов для количественного определения
ракового антигена СА-62 в сыворотке крови
человека методом иммунохемилюминесцентного
анализа (ИХА-СА-62) для диагностики *in vitro*

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	5
2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	6
3. ВИД МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	6
4. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА	6
5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	7
5.1 Принцип метода	7
5.2 Состав набора	8
5.3 Аналитические и диагностические характеристики	8
6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
6.1 Требования безопасности при работе с набором	10
6.2 Обеспечение получения правильных результатов анализа	11
6.3 Промывка микропланшетов	12
7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА	13
7.1 Материал для исследования	13
7.2 Взятие клинических образцов	13
8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ	13
9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И УТИЛИЗАЦИИ ТЕСТА	14
9.1 Условия хранения	14
9.2 Транспортирование	15
9.3 Утилизация	15
10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ	15
10.1 Подготовка планшета	16
10.2 Приготовление рабочего буферного раствора	17
10.3 Подготовка конъюгата «СА-62–Акридин»	17
10.4 Подготовка анализируемых образцов и их хранение	17
11. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	18
12. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
12.1 Детекция результатов	19
12.2 Расчет концентрации гликопротеина СА-62 в анализируемом образце	20
12.3 Интерпретация результатов	21
12.4 Ограничения метода	22
10. КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	25
11. ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	25

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «ИХА-СА-62» предназначен для количественного определения в сыворотке крови человека карцином-специфичного антигена СА-62 для обнаружения эпителиальных карцином различных локализаций у взрослого населения, независимо от пола и расы. Медицинское изделие «ИХА-СА-62» является вспомогательным методом *in vitro* диагностики и предназначено для помощи врачу в принятии медицинского решения.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов в дубликатах, включая стандартные калибраторы СА-62, и последующей хемилюминесцентной детекции люминесцентного конъюгата СА-62-Акридин, присоединившегося к специфическим моноклональным антителам анти-СА-62 в результате одностадийного конкурентного иммунохемилюминесцентного анализа ИХА-СА-62 на специализированных для этого приборах – флэш-люминометрах.

Развитие онкологических заболеваний вызывает появление в организме человека различных раковых антигенов, которые являются результатом измененного генома опухолевой клетки и идентифицируются как «опухолевые маркеры». Одним из таких маркеров является карцином-специфичный антиген СА-62, который экспрессируется в больших количествах на поверхности «малигнизированных» эпителиальных клеток с самого начала роста опухоли [1-4]. История выявления карцином-специфичного антигена СА-62 уходит в 1980-е годы и связана с работами как российских, так и зарубежных исследователей, подробно описанных в статьях [5-13]. Однако, несмотря на столь длительную историю открытия ракового антигена СА-62 – рецептора к АФП, до настоящего времени не было зарегистрировано ни одного диагностического теста на выявление этого высокочувствительного карцином-специфичного гликопротеина, повышенный уровень которого ассоциируется с наличием эпителиальных карцином различных локализаций и может использоваться для выявления процесса канцерогенеза [1-7, 9-11].

Раковый антиген СА-62 с молекулярной массой около 62 кДа представляет собой целое семейство гликопротеинов, которое присоединяет альфа-фетопrotein (АФП) при помощи особой комбинации олигосахаридов, расположенных на поверхности антигена СА-62. Специфические антитела, используемые в сывороточном иммунохемилюминесцентном анализе «ИХА-СА-62», узнают на молекулярном уровне онко-специфичный олигосахаридный фрагмент,

что позволяет идентифицировать все молекулярные формы ракового антигена. Опухолевые клетки выделяют две основные растворимые цитоплазматические фракции N-гликопротеина в кровь, что позволяет количественно измерять уровень антигена СА-62 в крови пациента [4, 5]. Таким образом, оценка экспрессии маркера эпителиальных карцином СА-62 может дать дополнительную информацию врачу при постановке диагноза [1-4].

Проведенные ранее исследования показали, что клетки эпителиальных карцином демонстрируют значительную экспрессию гликопротеиновых антигенов СА-62 во всех исследованных локализациях эпителиальных карцином (молочной железе, предстательной железе, легких, матке, желудке, почках, яичниках и др.) [1-4]. При этом большинство доброкачественных заболеваний и здоровых образцов не демонстрируют повышенной экспрессии маркера СА-62. Тест успешно прошел многочисленные пилотные клинические исследования в США и Европе, результаты которых получили высокую оценку зарубежных исследователей и клинических онкологов и были опубликованы в [1-4].

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

- клиническая лабораторная диагностика.

3. ВИД МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

- 342340.

4. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА

- сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ин витро диагностики. Назначение анализа и интерпретация результатов должна осуществляться врачом.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

5.1 Принцип метода

Набор реагентов «ИХА-СА-62» представляет собой одностадийный конкурентный вариант твердофазного иммунохемилюминесцентного анализа (ИХА), при котором происходит конкуренция между содержащимся в анализируемом образце карцином-специфичным антигеном СА-62 и люминесцентным конъюгатом СА-62-Акридин за связывание с моноклональными антителами к гликопротеину СА-62, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

Во время 2-х часовой инкубации к иммобилизованным специфическим антителам добавляется раствор, содержащий разбавленный образец сыворотки и фиксированную концентрацию меченого антигена, после чего сорбент отмывается от несвязавшихся компонентов и затем регистрируется люминесцентный сигнал образовавшихся на твердой фазе иммунных комплексов.

Несвязавшиеся компоненты удаляются во время отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс {анти-СА62-МаТ-(СА-62-Акридин)} регистрируется при помощи люминесцентного сигнала импульсным хемилюминометром. Величина регистрируемого люминесцентного сигнала продукта окисления субстрата обратно пропорциональна содержанию ракового антигена СА-62 в анализируемой пробе

Серия калибровочных проб (Стандартные калибраторы «СА-62») тестируется одновременно с образцами, на основе чего строится калибровочная кривая (Logit-Log кривая) для количественного определения гликопротеина СА-62 в единицах измерения (Ед/мл) в неизвестных образцах.

Положительный контрольный образец СА-62* представляет собой референтную пробу сыворотки крови человека с известным количеством антигена СА-62, растворенным в Рабочем буферном растворе с Твин-80.

*Примечание. Стандартные калибраторы и Положительный контрольный образец СА-62 проверены на отсутствие маркеров ВИЧ (антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1); гепатита В (HBsAg); гепатита С (антитела), *Treponema pallidum* (антитела) методом ИФА в тест-системах, зарегистрированных в РФ.

5.2 Состав набора

Стандартная упаковка тест-системы «ИХА-СА-62» содержит:

1. Планшет 96-луночный полистироловый стрипованный черного цвета для люминесценции, с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными IgM-антителами к раковому антигену СА-62, готовый для использования - 1 шт;
2. Конъюгат «СА-62-Акридин» с люминесцентным акридином, требует разведения, указанного в паспорте к медицинскому изделию - 0,1 мл (1 флакон);
3. Калибровочные пробы «Стандартные калибраторы СА-62», на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества СА-62 человека: 50, 250, 650, 1250, 2500, 5000, 7000 и 10000 Ед/мл, готовые для использования - 0,5 мл (8 флаконов);
4. Положительный контрольный образец на основе сыворотки крови с известным содержанием СА-62 (7000-10000 Ед/мл), готовый для использования - 1 мл (1 флакон);
5. Рабочий буферный раствор с Твин-80, готов к использованию - 25 мл (1 флакон);
6. Рабочий раствор А для диспенсера 1 хемилюминометра, готов к использованию - 25 мл (1 флакон);
7. Рабочий раствор Б для диспенсера 2 хемилюминометра, готов к использованию - 25 мл (1 флакон).

5.3 Аналитические и диагностические характеристики

Принцип анализа: одностадийный твердофазный конкурентный ИХА.

Количество определений: 48 (в дубликатах), включая стандартные калибраторы СА-62.

Аналитическая специфичность: аналитическая специфичность набора реагентов «ИХА-СА-62», т.е. способность выявлять только карцином-специфичный антиген СА-62, вне зависимости от присутствия в анализируемом образце других антигенов, белков и иммуноглобулинов человека, была доказана производителем при исследовании культуры клеток различных видов рака - MCF-7, T47D, Her G2, HeLa, SW-620, K-562, а также при изучении сыворотки крови пациентов, больных раком молочной железы, раком предстательной

железы или раком яичников. Специфичность, рассчитанная как соотношение истинноотрицательных результатов к общему количеству отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

Аналитическая чувствительность: в соответствии с разделом 5.4.1.7 ГОСТ Р 51352-2013, ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 п. А.2.7, это наименьшая величина, которая может быть обнаружена с достаточной уверенностью. Нормативные технические требования - чувствительность не превышает 35 Ед/мл с достоверностью 0,95.

Воспроизводимость: коэффициент вариации результатов определения концентрации СА-62 в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 10%.

Тест на прецизионность: проверяется тестом на «открытие»-соответствие измеренной концентрации СА-62, предписанной в образце, полученном при смешивании равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5000 Ед/мл СА-62. Процент «открытия» составляет 90-110%.

Тест на правильность определения концентрации: при детекции образцов с концентрациями от 1250 до 10000 Ед/мл СА-62 процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

Диапазон линейности: диапазон линейности составляет от 10000 до 250 Ед/мл СА-62.

Диапазон измерений: 50 - 10000 Ед/мл.

Объем исследуемого образца: 10 мкл.

Продолжительность анализа: 2 часа.

Клиническая проверка: концентрацию СА-62 измеряли в сыворотке крови у здоровых людей Западного региона России, Западной Европы, Западного и Восточного регионов Канады, Западного и Восточного регионов США в возрасте 20-75 лет. Средняя концентрация антигена СА-62 составляет 3500 Ед/мл в интервале 50-10000 Ед/мл. Для определения диагностической чувствительности и специфичности были проанализированы диверсифицированные группы больных и здоровых людей, которые относились к различным расам, включающим европеоидную, негроидную и монголоидную. Статистически значимых отличий между различными расами выявлено не было.

Учет результатов: импульсная хемилюминесценция на флэш-люминометре.

Срок хранения: 3 месяца при температуре от минус 20 до минус 30°C.

Входящие в состав набора калибровочные образцы являются готовыми к использованию, при этом конъюгат требует дополнительного разведения в буферном растворе с Твин-80. Набор реагентов произведен для диагностических целей (*in vitro* диагностика).

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

6.1 Требования безопасности при работе с набором

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

При работе с исследуемыми образцами в наборе реагентов «ИХА-СА-62» следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфицированным материалом, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и «ИНСТРУКЦИИ ПО МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ РАБОТЕ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. Стандартные калибраторы содержат компоненты человеческой крови и должны быть использованы и утилизированы в соответствии с требованиями, необходимыми для работы с биологическими и потенциально инфицированными образцами. Использовать эти реагенты и образцы крови пациентов необходимо в соответствии с установленной в мире надлежащей лабораторной практикой (GLP). Никогда не следует забирать реагенты при помощи рта и избегать контакта кожи или слизистой оболочки с реагентами и образцами.

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии с МУ-287-113 «МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ДЕЗИНФЕКЦИИ, ПРЕДСТЕРИЛИЗАЦИОННОЙ ОЧИСТКЕ И СТЕРИЛИЗАЦИИ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ» (УТВ. ДЕПАРТАМЕНТОМ ГОССАНЭПИДНАДЗОРА Минздрава РФ ОТ 30.12.1998). Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08

«Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Стандартные калибраторы, конъюгат и положительный контрольный образец содержат мертиолят (орто-этилртутьтиосалицилат натрия $C_9H_9HgO_2SN_9$, MW 404.8, CAS: 54-64-8), который обладает противомикробной активностью и широко используется во всем мире для предотвращения роста бактерий и фунгицидов в биологических образцах. Используемая итоговая концентрация мертиолята 0,02% в стандартных калибраторах, конъюгате и в исследуемых образцах набора реагентов «ИХА-СА-62», необходимая для предотвращения микробного роста в биологических образцах, является нетоксичной.

Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах по работе с микроорганизмами III–IV групп патогенности.

Образцы сыворотки, демонстрирующие повышенную липемию, сильный гемолиз или турбулентность, не должны использоваться для данного теста. Оптимальные результаты теста будут получены при строгом соблюдении этого протокола. Необходимо проводить аккуратное и точное пипетирование, без пенообразования образцов и компонентов набора реагентов также, как и следование точному временному и температурному режиму, описанному в протоколе. **Какие-либо отклонения от инструкций могут давать ошибочные результаты!**

Не использовать набор по истечении срока годности.

6.2 Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависит от выполнения следующих основных правил:

Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми образцами, следует использовать

дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИХА; например, не следует использовать щелочные растворы, а также четвертичные аммониевые соли, спирты и третичные амины;

Следует избегать загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого необходимо использовать в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого контроля, реагента и для каждого из дубликатов образца;

Рабочие поверхности столов, пипеточные дозаторы и оборудование следует обрабатывать 70% этиловым или изопропиловым спиртом.

Тестируемые образцы должны быть подготовлены для проведения теста в соответствии с рекомендациями в разделе 4;

При допущении ошибки во время внесения анализируемых образцов, нельзя, опорожнив лунку, вносить в нее новый образец: **такая лунка бракуется!**

6.3 Промывка микропланшетов

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

Для промывки микропланшета рекомендуется использовать автоматический промыватель микропланшетов (вошер).

Не следует допускать полного высыхания лунок планшета между завершением промывки и внесением реагентов.

Необходимо добиваться полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к искажению результатов анализа.

Необходимо следить за состоянием автоматического промывателя микропланшетов – следует еженедельно обрабатывать шланги и емкости 70% этиловым или изопропиловым спиртом.

Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой и еженедельно следует проводить процедуру промывки 70% раствором этилового или изопропилового спирта и последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1 Материал для исследования

Материалом для исследования набором реагентов «ИХА-СА-62» является сыворотка крови человека.

7.2 Взятие клинических образцов

Для получения сыворотки крови, используемой при клинико-химических или серологических исследованиях, делают забор венозной крови в вакуумные пробирки без антикоагулянтов, в соответствии со стандартом ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения пре-аналитического этапа»:

- Сразу после забора крови перевернуть вакуумную пробирку 5 раз и оставить в вертикальном положении при комнатной температуре до полного сворачивания крови в течение часа.
- Центрифугировать вакуумные пробирки со свернувшейся кровью следует в течение 10 мин при ускорении 1000-1200 g.
- Перенести 1 мл сыворотки в криопробирку с завинчивающейся крышкой, плотно закрыть крышку контейнера до использования образца.
- Следует избегать многократных циклов замораживания и оттаивания образцов.
- На один анализ в дубликate потребуется 20 мкл сыворотки одного пациента.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы, не поставляемые с набором реагентов:

- Микропланшетный импульсный (флэш) люминометр типа Anthos Lucy 2 (Biochrom Ltd, 22Cambridge, CB4 0FJ, UK, Великобритания, РУ на МИ от 05.11.2008 № ФСЗ 2008/02880) или аналогичный, имеющий один или два инжектора, для считывания люминесцентного сигнала в лунках, вызванного реакцией окисления люминофора. Для считывания люминесцентного сигнала не требуется дополнительного

- фильтра в приборе;
- Баня-термостат водяная с температурным диапазоном от +5 до +100°C;
- Автоматический промыватель планшетов;
- Вортекс лабораторный;
- Холодильник с морозильной камерой (температурный режим от минус 20 до минус 35 °C);
- Центрифуга медицинская лабораторная;
- Дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 2 до 1000 мкл;
- Наконечники для дозаторов объемом 0,5-10 мкл, 50-200 мкл и 100 1000 мкл;
- Ванночки для буферных растворов;
- Таймер лабораторный;
- Перчатки нитриловые одноразовые медицинские;
- Вода дистиллированная;
- Пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом не менее 10 мл.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И УТИЛИЗАЦИИ ТЕСТА

9.1 Условия хранения

Набор реагентов «ИХА-СА-62» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя в замороженном виде при температуре от минус 20 до минус 30 °C в течение всего срока годности (3 месяца). Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

Дробное использование набора может быть реализовано в пределах срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

9.2 Транспортирование

Набор реагентов «ИХА-СА-62» транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом (условия транспортирования соответствуют условиям хранения)) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств в замороженном виде в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток с термоконтролем.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

9.3 Утилизация

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10. Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор. Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически-опасные отходы). Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) /обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами. Производитель теста гарантирует качество, безопасность и эффективность продукта при условии выполнения требований к условиям хранения, транспортирования и применения теста в соответствии с прилагаемыми инструкциями, при тестировании образцов сыворотки. Какие-либо отклонения от рекомендаций теста могут дисквалифицировать его результат.

10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа необходимо вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при комнатной температуре не менее одного часа.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы и оставшиеся стрипы планшета следует немедленно плотно закрыть, поместить в холодильник и хранить при температуре от минус 20 до минус 30 °С в пределах срока годности набора.

Стандартные калибраторы, планшет с иммобилизованными антителами и рабочий буферный раствор с Твин-80 готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. Конъюгат набора реагентов «ИХА-СА-62» требует разбавления, указанного на этикетке, для получения разбавленного раствора с использованием рабочего буферного раствора с Твин-80. Точное разведение конъюгата указано на этикетке каждой партии конъюгатов «СА 62-Акридин» и паспорте на серию набора реагентов. Разбавленный раствор конъюгата необходимо использовать в течение часа во избежание потери люминесцентного сигнала. Рекомендуется разбавлять рабочий раствор конъюгата в центрифужной пробирке с закручивающейся крышкой типа Фалкон, обернутой фольгой.

Пробирки со стандартными калибраторами тест-системы «СА-62» необходимо аккуратно перемешать на вортексе без вспенивания раствора для полного перемешивания. **Не допускается образования пены при пипетировании! Необходимо использовать отдельный наконечник для каждого калибратора.**

При желании в тесте можно использовать Положительный контроль СА-62, который не является обязательным к использованию при проведении теста и предназначен лишь для возможности контроля работы тест-набора при его хранении. При использовании Положительного контроля СА-62 его вносят в лунки планшета в объеме 50 мкл/лунку. Положительный контроль СА-62 должен храниться в замороженном виде при минус 20 °С в течение всего срока годности набора.

10.1 Подготовка планшета

Вскрыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов для проведения анализа. Планшет с иммобилизованными антителами уже готов к использованию. Неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть и поместить в морозильник от минус 20 до минус 30 °С.

Хранить при температуре от минус 20 до минус 30 °С в течение всего

срока годности (3 месяца с даты приготовления).

10.2 Приготовление рабочего буферного раствора

Рабочий буферный раствор с Твин-80, готов к использованию и не требует дальнейшего разбавления. Необходимо разморозить флакон с рабочим буферным раствором, довести его до комнатной температуры и перелить необходимое количество раствора в ванночку для буферных растворов и пробирку типа Фалкон. Рабочий буферный раствор содержит высокую концентрацию Твин-80, что вызывает пенообразование раствора в пределах нормы. Остатки буферного раствора после использования необходимо утилизировать. Не допускается сливать остатки буферного раствора во флакон с исходным раствором.

10.3 Подготовка конъюгата «СА-62–Акридин»

Конъюгат «СА-62–Акридин» представляет собой концентрированный раствор меченого люминесцентным акридином ракового антигена в фосфатно-солевом буферном растворе, который необходимо разбавить в Рабочем буферном растворе с Твин-80 до указанной на этикетке конъюгата концентрации (или указанной в паспорте на серию) для получения разбавленного раствора конъюгата.

10.4 Подготовка анализируемых образцов и их хранение

Для корректного выполнения анализа с использованием набора реагентов «ИХА-СА-62» все анализируемые образцы должны пройти предварительную пробоподготовку, которая заключается в термообработке всех образцов на водяной бане при плюс 56°С в течение 30 минут (при объемах образца 0,5 мл – 1 мл). **Несоблюдение этой процедуры изменит результаты теста!**

Образцы с консервантом могут храниться в течение 3-х недель при плюс 4°С до их использования. В случае более длительного хранения образцы должны быть заморожены при минус 20 °С или минус 70 °С, по мере возможности.

Разведение анализируемых образцов 1:10 производится в самих лунках планшета при смешении 10 мкл образца с 40 мкл рабочего буферного раствора с Твин-80 и последующего добавления к смеси 50 мкл разбавленного раствора конъюгата «СА-62–Акридин».

11. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Все реагенты, стандартные калибраторы и образцы необходимо довести до комнатной температуры перед выполнением теста и тщательно перемешать перед их использованием. Стандартные калибраторы и тестируемые образцы обрабатываются единообразно и должны тестироваться в дубликатах.

Внимание: разбавленные образцы и рабочий раствор конъюгата «СА-62–Акридин» должны быть свежеприготовленными. Не следует использовать заранее разбавленные и хранящиеся материалы, поскольку это может изменить результаты измерений теста.

1. Используйте необходимое количество стрипов из разборных планшетов с иммобилизованными антителами к СА-62 для выполнения анализа.
2. Внесите по 50 мкл стандартных калибраторов СА-62 в лунки А-Н в дубликатах.
3. С использованием одноканального дозатора с переменным объемом внесите по 10 мкл каждого анализируемого образца* в две соседние пустые лунки (дубликаты) с иммобилизованными антителами. **ВНОСИТЕ КАПЛЮ СЫВОРОТКИ В ЛЕВУЮ ЧАСТЬ ДНА ЛУНКИ, ПРИ ЭТОМ КАЖДЫЙ РАЗ МЕНЯЯ НАКОНЕЧНИК. Время внесения образцов не должно превышать 30 минут при использовании всех лунок планшета.**
4. Используя 8-канальный дозатор, внесите в лунки планшета по 40 мкл рабочего буферного раствора с Твин-80 для промежуточного разбавления образцов: это предотвратит их высыхание.
5. Тщательно перемешайте образцы в лунках при помощи постепенного похлопывания разных сторон микропланшета.

Разведите конъюгат «СА-62–Акридин» в соответствии с указанным фактором разбавления для получения разбавленного раствора конъюгата с рабочей концентрацией X мкг/мл в пробирке с винтовой горловинной крышкой объемом не менее 10 мл. На целый планшет необходимо приготовить 6 мл разбавленного раствора конъюгата в буферном растворе с Твин-80. Аккуратно смешайте полученный разбавленный раствор конъюгата при помощи вортекса, избегая сильного вспенивания. Затем при помощи 8-канального дозатора внесите по 50 мкл разбавленного раствора конъюгата «СА-62–Акридин» во все лунки (итоговая концентрация конъюгата

в лунках при этом составит $X/2$ мкг/мл). Тщательно смешайте реакционную смесь при помощи постепенного похлопывания разных сторон микропланшета.

6. Закройте микропланшет защитной пленкой и алюминиевой фольгой, и выдерживайте при комнатной температуре (22-25°C) в течение 2-х часов.
7. Вылейте или аспирируйте содержимое лунок и промойте планшет 6 раз дистиллированной водой с использованием микропланшетного вошера или промывочной бутылки, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок стрипа. В каждую лунку вносите по 270 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончанию промывки переверните планшет на адсорбирующую бумагу или медицинскую салфетку для удаления излишков жидкости.
8. Для регистрации данных эксперимента установите в люминометре «пустой» фильтр («<--->», «blank») для регистрации данных.

* Положительный контрольный образец «СА-62» не требует предварительного разбавления и вносится в лунку микропланшета в объеме 50 мкл, с последующим добавлением разбавленного раствора конъюгата «СА-62–Акридин».

12. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1 Детекция результатов

Детекция люминесцентного сигнала в лунках, вызванного реакцией окисления люминофора, осуществляется на микропланшетном импульсном (флэш)-люминометре типа Anthos Lucy 2 (Biochrom Ltd, 22 Cambridge, CB4 0FJ, UK, Великобритания, РУ на МИ от 05.11.2008 № ФС32008/02880) или аналогичного, имеющего один или два инжектора.

- При проведении эксперимента на люминометре с ОДНИМ инжектором.

При помощи ручного мультиканального дозатора добавляется Рабочий раствор А для инжектора 1 хемилюминометра по 50 мкл в каждую лунку микропланшета, после чего микропланшет устанавливается в прибор для считывания результатов. Инжектор люминометра должен диспенсировать по 50 мкл в лунку Рабочего раствора Б для инжектора 2 хемилюминометра и считывать результаты

лунки в течение 0,25 - 1 секунды. Время интеграции должно быть установлено в соответствии с чувствительностью люминометра. Для люминометра Anthos Lucy 2 рекомендуемое время считывания 1 секунда

- При проведении эксперимента на люменометре с ДВУМЯ инжекторами.

На приборе устанавливается объем диспенсирования инжектора 1 по 50 мкл в каждую лунку Рабочего раствора А, а объем диспенсирования инжектора 2 – по 50 мкл рабочего раствора Б. Время ожидания между диспенсированием инжекторов 1 и 2 устанавливается на 0,5 секунд. Считывание результатов должно быть выполнено в течение 1 секунды после окончания диспенсирования второго инжектора. После этого прибор считывает и регистрирует относительные единицы света (RLU) для каждой лунки микропланшета.

12.2 Расчет концентрации гликопротеина СА-62 в анализируемом образце

Калибровочный график представляет собой логарифмическую функцию с отрицательным наклоном (то есть чем ниже единицы измерения, тем больше единицы СА-62). С помощью программы Microsoft Excel рассчитайте величины СА-62 образцов следующим образом:

1. Рассчитайте среднеарифметическую величину RLU для каждого калибратора, и для каждого образца сыворотки (дубликаты).
2. Постройте калибровочную кривую: по оси y отложите измеренную величину RLU калибраторов, по оси x - величину измерения калибраторов в единицах СА-62. Измените формат горизонтальной оси на логарифмическую шкалу нажатием на правую клавишу мыши. Определите логарифмическую функцию соответствующему графику. Величина R^2 не должна быть менее 0,9, в противном случае, необходимо будет повторить измерения для всего ряда образцов.
3. Для интерполирования единиц измерения гликопротеина (СА-62 Ед/мл), используйте коэффициенты логарифмического уравнения $y = a \cdot \ln(x) + b$, в котором a и b являются коэффициентами в формуле, рассчитанной по Excel (см. Рис. 1, $a = -6,322$ и $b = 66,84$). Необходимо решить уравнение и определить величину x для каждого индивидуального образца, используя измеренные величины y , что осуществляется расчетами с использованием следующего уравнения: $=EXP((RLU - b) / a)$. Необходимо помнить, что

коэффициент « a » будет отрицательным числом.

4. Образцы с величинами RLU, попадающими вне шкалы стандартной кривой, не должны быть экстраполированы на эту кривую. Вместо этого, результаты измерений должны быть указаны как $> \text{Max}$ или $< \text{Min}$, где Max и Min представляют собой единицы измерения СА-62 Ед/мл самого большого и самого низкого калибровочного стандарта, соответственно.
5. Образцы с величинами единиц СА-62, превышающими самый большой калибратор, могут быть соответственно разбавлены Рабочим буферным раствором с Твин-80, после чего точная концентрация определяется при умножении на фактор разбавления.

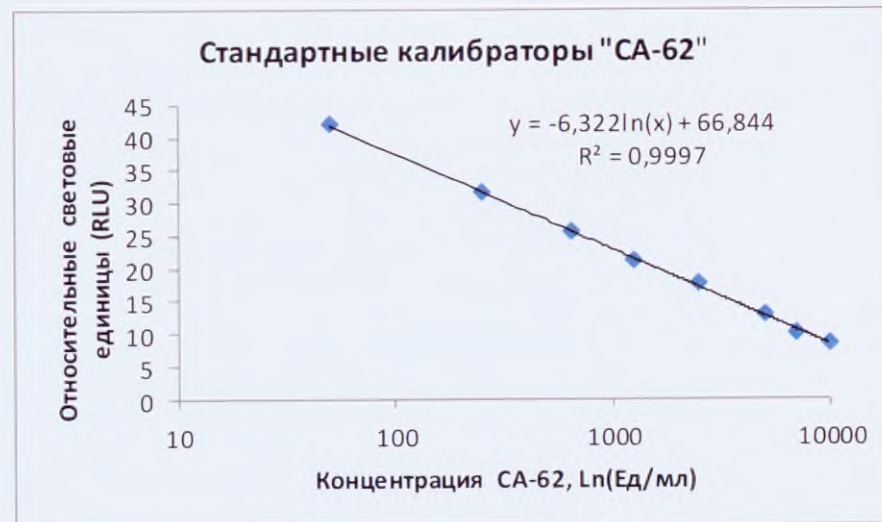


Рис. 1 Калибровочная кривая

12.3 Интерпретация результатов

Анализ полученных ранее данных по исследованию пациентов с различными онкологическими заболеваниями [1-4] показал, что значительное повышение уровня онкоспецифического гликопротеина СА-62 в крови пациентов, по сравнению с нормальным уровнем этого рецептора в сыворотке здоровых людей, напрямую связано с развитием канцерогенеза. Пороговое значение СА-62 составляет 5000 Ед/мл, при этом референтный диапазон (интервал), отражающий нижнюю и верхнюю границу нормы лабораторного показателя СА-62, составляет 50 – 5000 Ед/мл. Таким образом, результаты, выходящие за пределы

референтных значений маркера и превышающие пороговое значение в 5000 Ед/мл, могут служить достаточным основанием для поиска причин необычной экспрессии ракового антигена СА-62, который может сигнализировать о возможном патологическом процессе.

12.4 Ограничения метода

1. Набор реагентов «ИХА-СА-62» предназначен исключительно для *in vitro* диагностики.
2. Корректные результаты могут быть получены только в сыворотке крови человека, полученной из венозной крови. Образцы плазмы крови для данного теста не подходят.
3. Наличие цитрата, оксалата, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) или других хелатирующих агентов, также как и гепарина в образцах, сделают результаты теста некорректными.
4. Образцы от пациентов с беременностью, кормящих, с острыми кровопотерями, постраневым состоянием, состоянием после иммунизации и воспалительным процессом исследованию не подлежат, так как потенциально могут привести к ложноположительным результатам теста.
5. Поскольку набор реагентов «ИХА-СА-62» является вспомогательным методом *in vitro* диагностики для помощи врачу в принятии медицинского решения, он не предназначен для тестирования выявленных онкобольных в процессе их лечения.
6. Набор реагентов «ИХА-СА-62» необходимо использовать только по назначению врача.
7. Влияние интерферирующих веществ таких как сывороточные белки (билирубин, холестерин, гемоглобин, сывороточный альбумин человека, альфа-1, альфа-2-глобулины, бета-глобулины, гамма-глобулины, общие триглицериды) и онкомаркеры (РЭА, СА 125, ПСА, СА 19-9, СА 15-3, АФП) в пределах физиологических норм на результаты измерений уровня маркера СА-62 не обнаружено. Превышение уровня физиологических норм указанных интерферирующих веществ потенциально могут привести к ложноположительным результатам теста:

№ п/п	Исследуемое Вещество	Нормальные значения	Диапазон, при котором не оказывается влияние
1	Билирубин	менее 12 мг/л (< 21 мкмоль/л)	От 0 до 14,6 мг/л (25 мкмоль/л)
2	Холестерин	менее 2 г/л (< 5,18 ммоль/л)	От 0 до 2,7 г/л (7 ммоль/л)
3	Гемоглобин	117 -160 г/л (7,2 – 9,93 ммоль/л)	От 0 до 180 г/л (11,2 ммоль/л)
4	Сывороточный альбумин человека (ЧСА)	35,0 -54,8 г/л (532 – 833 мкмоль/л)	От 35,5 до 86,8 г/л (540 – 1319 мкмоль/л)
5	Альфа-1- глобулины	1,3 – 4,2 г/л (43 – 140 мкмоль/л)	От 1,4 до 17 г/л (46,7 – 567 мкмоль/л)
6	Альфа-2- глобулины	3,9 - 8,5 г/л (130 -283 мкмоль/л)	От 4,7 до 63 г/л (156,7 2100 мкмоль/л)
7	Бета-глобулины	4,0 – 12,5 г/л (0,34 – 1,06 ммоль/л)	От 4,7 до 60 г/л (0,4 -5,1 ммоль/л)
8	Общие Триглицериды	менее 1,5 г/л (< 1,7 ммоль/л)	От 0 до 2,5 г/л (2,8 ммоль/л)
9	Гамма-глобулины	7,3 – 13,5 г/л (76,8 – 142 мкмоль/л)	От 8,2 до 50 г/л (40 – 526 мкмоль/л)

10	РЭА, раковый эмбриональный антиген	0 – 4,8 мМЕ/мл (0 - 3,8 нг/мл)	От 0 до 220 мМЕ/мл (0 - 20 нг/мл)
11	СА 125, Раковый антиген	0 – 35 Ед/мл	От 0 до 150 Ед/мл
12	ПСА, простат-специфический антиген	0 – 4 нг/мл	От 0 до 80 нг/мл
13	СА 19-9, Раковый антиген	0 – 24 Ед/мл	От 0 до 100 Ед/мл
14	СА 15-3, Раковый антиген	0 – 30 Ед/мл	От 0 до 150 Ед/мл
15	АФП, Альфа-фетопротеин	0 – 12 МЕ/мл (0 - 15 нг/мл)	От 0 – 50 МЕ/мл (0 – 62,5 нг/мл)

8. Результаты анализа для пациентов с карциномами IV стадии статистически могут проявлять повышенную вероятность получения ложноотрицательных результатов. Врач при оценке результатов анализа должен учитывать анамнез и общее состояние пациента.
9. При оценке результатов теста врач должен руководствоваться анамнезом и статистическим распределением уровня маркера у здоровых и больных, поскольку часть здоровых людей и пациентов с доброкачественными опухолями могут демонстрировать повышенный уровень экспрессии маркера СА-62 (на данной стадии исследований неизвестно, не находятся ли отдельные доброкачественные новообразования в процессе перехода в злокачественные).
10. Образцы сыворотки, демонстрирующие повышенную липемию, сильный гемолиз или турбулентность, не должны использоваться для данного теста. Такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию.

10. КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

По вопросам, касающимся качества набора, и в случае возникновения претензий, обращаться в ООО «ДЖЕЙВИС ДИАГНОСТИКС» по адресу:

143026, г. Москва, СКОЛКОВО, Большой бульвар 42, стр. 1, офис 503.

Тел.: +7(985)613-54-31

E-mail: info@oncomarker.ru

11. ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ricardo Moro, Janneta Gulyaeva-Tcherkassova, Petra Stieber. Increased AFP-Receptor (RECAF) values in the serum of patients with early stages of breast cancer. Journal of Current Oncology 2012, Vol. 19, N. 1, P. 1-8.
2. Janneta Tcherkassova, Carolina Abramovich, Rafael Moro, Chen Chen, Ralph Smit, Angela Gerber, Ricardo Moro. Combination of CA125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer. Tumor Biol 2011, Vol. 32, No. 4, P. 831-838.
3. Moro R., Tcherkassova J., Song E., Shen G., Moro R., Schmid R., Hu X., Kummer A., Chen C., A new broad-spectrum cancer marker. In-Vitro Diagnostic Technology, 2005, N5, P.1-6.
4. Dowell B., Frost S., Tcherkassova J., Gerber A., Moro R., and Moro R. Development of a Chemiluminescent Assay (CIA) for the Receptor of Alpha Fetoprotein (RECAF) to Separate Cancer from Normal Sera, XXXVth Congress of the International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine, September 15 – 19, 2007, Prague, Czech Republic
5. Moro, R., et al., Monoclonal antibodies directed against a widespread oncofetal antigen: the alpha-fetoprotein receptor. Tumor Biol, 1993. 14(2): P. 116-130.
6. Трещалина Е.М., Смирнова Г.Б., Цуркан С.А., Черкасова Ж.Р., Лесная Н.А. Роль рецептора альфа-фетопротеина в разработке таргетных препаратов в онкологии. Российский онкологический журнал. 2017; 22 (1), С. 4-14.
7. Janneta Tcherkassova, Sergei Tsurkan, Galina Smirnova, Julia Borisova, Ricardo Moro and Helen Treshalina. Binding characterization of the targeting drug AIMPILA to AFP receptors in human tumor xenographs. Tumor Biology 2017 online access P. 1–11. DOI: 10.1177/1010428317734815 journals.sagepub.com/home/tub.
8. Молдогазиева Н. Т., Терентьев А. А. Альфа-фетопротеин и факторы роста. Структурно-функциональные взаимоотношения и аналогии.

Успехи биол. химии, 2006, Т. 46, С. 99 -148.

9. Смирнова Г.Б., Цуркан С.А., Борисова Ю.А., Черкасова Ж.Р., Романенко В.И., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Чувствительность *in vivo* опухолей человека с различной экспрессией рецептора RECAF к АФП-содержащему комплексу АИМПИЛА. Российский онкологический журнал. 2017. Т. 22. № 5. С. 288-291.

10. Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Трещалина Е.М. Специфичность связывания препарата АИМПИЛА с рецепторами α -Фетопротеина на поверхности опухоли человека T47D из коллекции РОНЦ им. Н.Н. БЛОХИНА. Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С. 117.

11. Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Трещалина Е.М. Экспрессия рецепторов к α -Фетопротеину в гомогенатах опухолей человека SW620, T47D и в культуре клеток HEPG2 из коллекции РОНЦ им. Н.Н. БЛОХИНА. Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С. 116-117.

12. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А., Малютина Н.Н., Орлов О.А. Альфа-фетопротеин. Монография, Рос. акад. наук, Ур. отделение, Ин-т иммунологии и физиологии УрО РАН, Перм. гос. мед. акад. МЗ РФ, ЗАО "Ин-т новых мед. технологий" ; [отв. ред. Н. Н. Кеворков]. Екатеринбург, 2004,-376с., ISBN 5-7691-1498-3.
http://www.biomedservice.ru/preparat/libr_alfetin3.pdf

13. Абелев Г.И. Дифференцировочные антигены гемобластозов и эпителиальных опухолей: связь с механизмами трансформации и прогрессии. Онтогенез. 2006.Т. 37. № 3. С.227-233.