

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора
от «__» ____ 20__ г. № ____



Генеральный директор

«ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

«23» ноября 2011 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
РАКОВОГО АНТИГЕНА СА 15-3
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ОнкоИФА - СА 15-3»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-СА 15-3» предназначен для количественного определения ракового антигена СА 15-3 в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. При исследовании на СА 15-3 измеряется концентрация белкового продукта гена MUC1. СА 15-3 - большой трансмембранный гликозилированный белок, содержащий три основных домена: большой внеклеточный участок, внутримембранную последовательность и цитоплазматический домен. Хотя физиологическая функция белка MUC1 до конца не выяснена, показано, что этот гликопротеин вовлечен в процессы межклеточной адгезии, иммунные реакции и образование метастазов. По сравнению со здоровой тканью молочной железы, в ткани карциномы молочной железы белок MUC1 определяется в более высокой концентрации, но отличается меньшей степенью гликозилирования.

Повышенные концентрации СА 15-3 отмечают при раке легкого, яичников, прямой кишки. Однако известно, что у 2 % здоровых женщин концентрация СА 15-3 может быть повышена. Также есть данные, что у 7 % пациентов с незлокачественными заболеваниями отмечают повышенные концентрации СА 15-3. Поэтому с клинической точки зрения определение только концентрации СА 15-3 не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами.

В настоящее время наиболее важным клиническим применением определения СА 15-3 является мониторинговая терапия пациентов с распространенным раком молочной железы, который невозможно оценить иными клиническими или радиологическими методами. Для прогнозирования течения заболевания у пациентов с впервые диагностированным раком молочной железы необходимо рассматривать данные о концентрации СА 15-3 до операции в сочетании с иными прогностическими факторами.

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

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ОнкоИФА-СА 15-3» использован двухстадийный «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа (Рисунок 1). На первой стадии анализа СА 15-3, содержащийся в контрольной сыворотке, калибровочных и исследуемых пробах, связывается с моноклональными антителами к СА 15-3, конъюгированными с биотином (на Рисунке 1: МАТ1-биотин). В результате реакции образуется комплекс, который, в свою очередь, связывается со стрептавидином, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. При удалении промывкой содержимого из лунок происходит разделение свободных и связанных антителами белков сыворотки и плазмы крови. На второй стадии анализа при добавлении конъюгата, содержащего моноклональные антитела, специфичные к другому эпитопу молекулы СА 15-3, меченное пероксидазой хрена антитело (на Рисунке 1: МАТ2-пероксидаза) связывается с молекулами СА 15-3, которые ранее были иммобилизованы во время первой инкубации.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации СА 15-3 в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА 15-3 в исследуемых образцах.

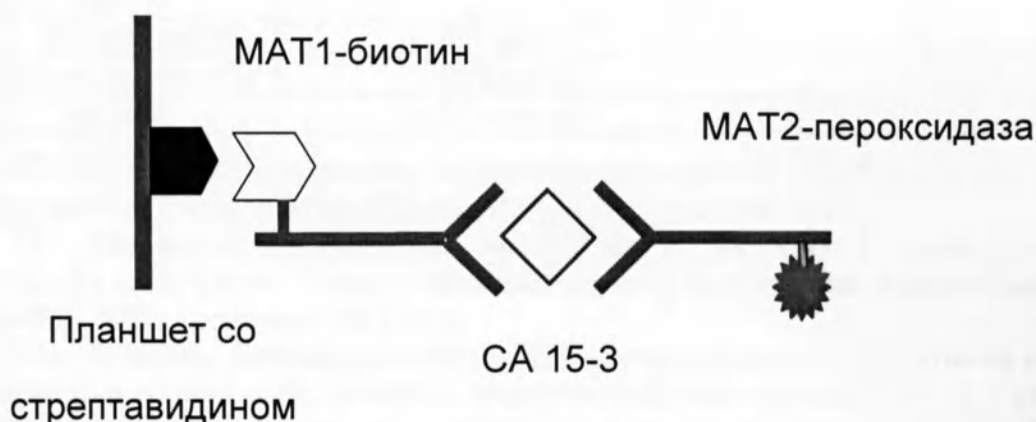


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином» – 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества СА 15-3. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций СА 15-3 в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 10; 40; 100; 200; 400 Ед/мл – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 1,0 мл);
- конъюгат, содержащий моноклональные антитела к СА 15-3 с биотином, маркирован «Конъюгат Е №1» – 1 флакон (12 мл);
- конъюгат, содержащий моноклональные антитела к СА 15-3 с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е №2» – 1 флакон (12 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер М» – 1 флакон (20 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови, маркирован «Буфер Д» – 1 флакон (50 мл);

- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием СА 15-3, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к СА 15-3 с другими анализатами и интерференция приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Вещество	Исследованная концентрация	Перекрестная реакция
СА 15-3	-	100%
СА 125	10 000 Ед/мл	0,1%
СА 19-9	5 000 Ед/мл	0,1%
ПСА	1000 нг/мл	2,6%
АФП	30 000 нг/мл	Не определяется
РЭА	5 000 нг/мл	Не определяется
ХГч	125 000 мМЕ/мл	Не определяется
Ревматоидный фактор	12 500 МЕ/мл	0,1%
Билирубин	200 мкг/мл	Не определяется
Продукты гемолиза	30 мкл/мл	Не определяется
Липиды	50 мкг/мл	0,9%

3.2. Коэффициент вариации результатов определения СА 15-3 в одном и том же образце с использованием набора «ОнкоИФА-СА 15-3» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 15-3 в исследуемых образцах при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» СА 15-3 — проверка соответствия значения определяемой концентрации СА 15-3 расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №3 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 15-3 в сыворотке и плазме крови человека не превышает 0,2 Ед/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях анализата зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ОнкоИФА-СА 15-3» хук-эффект не наблюдается.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. У большинства здоровых женщин концентрация СА 15-3 ≤ 37 Ед/мл.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будет определен диапазон ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм, 405 нм и 620 нм (референтная длина волны). Применение длины волны 620 нм не является обязательным, но позволяет обнаружить интерференцию пластика;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

– цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;

– стакан стеклянный подходящего объема;

– вода дистиллированная;

– бумага фильтровальная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

– контейнер для дезинфекции;

– ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2...8°C не более 5 суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой внести по 1 мл дистиллированной воды, во флакон с контрольной сывороткой – 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Буфер Д готов к использованию.

7.1.4. Конъюгат Е №1, Конъюгат Е №2 готовы к использованию. Расход конъюгатов на один стрип составляет по 1,0 мл.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз. Например:

5 мл буфера М + 245 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор ТМБ готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 0,75 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

7.1.9. Разведение исследуемых образцов.

Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и контрольной сыворотки) должны быть разведены буфером Д в 21 раз:

500 мкл буфера Д + 25 мкл исследуемого образца.

При разведении необходимо тщательное перемешивание.

Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. п.9.3.) значения концентраций СА 15-3 в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует дополнительно развести буфером Д в 10 раз и более.

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

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

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2.Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 25 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов в дубликатах.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.3.Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата Е №1.

***Примечание:** Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну покрытой стрептавидином лунки.*

7.2.4.Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20-30 секунд.

7.2.5.Инкубировать стрипы в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25°C) в темноте без шейкирования.

7.2.6.По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.7.1.5., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.7.Внести во все лунки, кроме A1 и A2, по 100 мкл конъюгата Е №2.

7.2.8.Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 60 минут без шейкирования.

7.2.9.По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок путем декантирования или аспирации и промыть лунки согласно п.7.2.6.

7.2.10.Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15-30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.11.Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 15-20 секунд.

7.2.12.Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.11., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре (+18...25°C).

***Примечание:** максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

Если оптическая плотность калибровочной пробы №6 превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед.ОП при 450 нм.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации СА 15-3 (Ед/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: при применении референтной длины волны 620 нм оптические плотности каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки и исследуемых образцов, полученные при 620 нм, вычитают из оптических плотностей, полученных при основной длине волны, эти значения используют для построения калибровочного графика.

Примечание 2: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 3: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание СА 15-3 в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА 15-3 умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации СА 15-3, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации СА 15-3 в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.9.

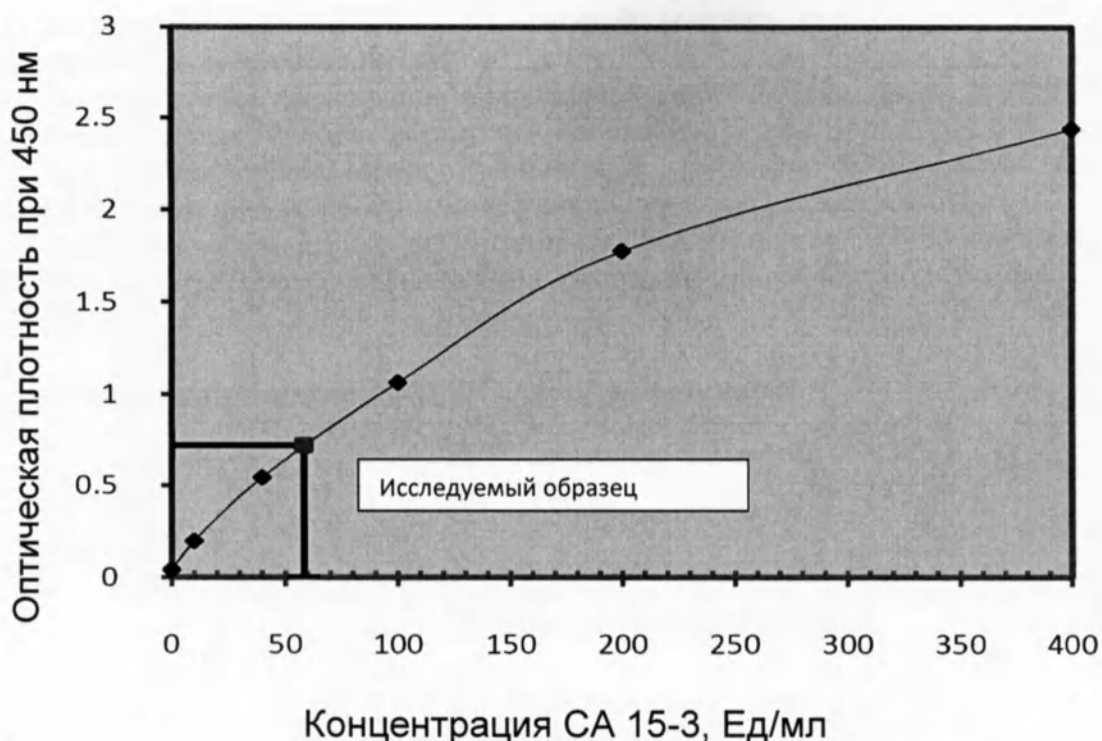


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-СА 15-3» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

- стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку (жидкие, готовые к использованию и восстановленные из лиофилизированных препаратов), конъюгат Е №1, конъюгат Е №2, раствор ТМБ, буфер М, стоп-реагент и буфер Д после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$, промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации СА 15-3 в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгатов, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент, ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ и стоп-реактента, входящих в состав данного набора.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

10.9. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

Примечания к приложению 1: КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C);

ПО — программное обеспечение.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА - СА 15-3» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»

Лукиянов Д.В.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГБОУ ДПО
РМАПО Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор Долгов В.В.
« 30 » 05 2012 г.

Подпись
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись
" " 20__ года