

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации опухолевого маркера СА 15-3
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

СА 15-3 – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
T-8472

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА 15-3 – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации ракового антигена СА 15-3 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

1.3. СА 15-3 является важным опухолевым маркером, используемым в диагностике рака молочной железы и мониторинге течения заболевания. Он обладает достаточно высокой специфичностью (95%) при раке молочной железы в сравнении с ее доброкачественными заболеваниями. Уровень СА 15-3 может быть повышен при доброкачественных заболеваниях молочной железы, однако, в отличие от злокачественного процесса, в этом случае не наблюдается значимого роста концентрации маркера в динамике или превышение критического уровня маркера будет преходящим.

При исследовании СА15-3 следует учитывать его индивидуальную информативность при различных формах и распространенности опухолевого процесса. Частота выявления повышенных значений СА15-3 и его концентрация напрямую зависят от размера опухоли, вовлечения в процесс лимфоузлов, наличия отдаленных метастазов и варьирует от 30 до 90%. Поэтому определение уровня СА15-3 в сыворотке крови наиболее информативно для мониторинга течения заболевания и эффективности проводимой терапии. Именно динамика уровня опухолевого маркера является более информативной, чем его единичное определение. Это может обеспечить выявление рецидива до клинической или радиологической манифестации заболевания.

Регулярное измерение концентрации СА15-3 необходимо использовать для контроля проводимого лечения. Устойчивое снижение уровня опухолевого маркера свидетельствует об эффективности проводимой терапии. Принято считать, что увеличение концентрации маркера в сыворотке на 25% является признаком прогрессирования заболевания. Следует отметить, что после радиотерапии, химиотерапии может наблюдаться преходящий подъем уровня опухолевого маркера, как результат деструкции опухоли.

Для усиления диагностической значимости определения СА15-3 у больных раком молочной железы целесообразно дополнительно исследовать

содержание в крови некоторых других маркеров опухолевого роста. Наиболее распространенным является комплекс СА15-3 /РЭА. Одновременное определение этих маркеров позволяет диагностировать метастазы у 60–80% пациентов.

При опухолях другой локализации, в частности, при карциноме яичников, шейки матки, эндометрия, легких, кишечника, повышение уровня СА 15-3 наблюдается только на поздних стадиях развития заболевания.

Концентрация маркера может возрастать при заболеваниях, связанных с поражением серозных оболочек: экссудативном плеврите, панкреатите, асците, перикардите, перитоните, аутоиммунных заболеваниях, а также при доброкачественных заболеваниях яичников, эндометриозе, при менструации, беременности и лактации.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестных проб, 6 калибровочных образцов и одного контрольного образца при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител.

В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител к

СА 15-3 с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит связывание СА 15-3 с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации СА 15-3 в анализируемых образцах.

Концентрацию СА 15-3 в анализируемых пробах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания СА 15-3 в калибровочных образцах.

2.2 СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к СА 15-3 – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества СА 15-3 – 0; 10; 25; 50; 100; 250 Ед/мл; готовые для использования – 6 фл. по 0,4 мл;
- контрольный образец с известным содержанием СА 15-3, готовый для использования – 1 фл., 0,4 мл;
- конъюгат моноклональных антител к СА 15-3 с пероксидазой хрена, концентрат – 1 фл., 2,5 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 10 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;

- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции используемых моноклональных антител к СА 15-3 с другими онкомаркерами: РЭА, СА 19-9, СА 125.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания СА15-3 в одном и том же образце с использованием набора «СА 15-3-ИФА-БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации СА15-3 при разведении анализируемых проб раствором для разведения сывороток не превышает 10% в диапазоне концентраций 10–250 Ед/мл.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» СА15-3 – соответствие измеренной концентрации СА15-3 предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 25 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

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

3.6. Клиническая проверка. Концентрация СА 15-3 в сыворотке крови здоровых женщин не превышает 30 Ед/мл.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.4. Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. *В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.*

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые пер-

чатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом

режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и 650 об/мин;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10, 25, 100, 300 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100 и 300 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $2\text{--}8^\circ\text{C}$ не более 5 суток или при температуре минус 20°C не более 3 мес.

Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугирова-

нием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин при температуре 18–25°C.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.2.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть закручивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидаина		Рабочий буферный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мЛ	Рабочий буферный раствор, мЛ	ТМБ, концентрат, мЛ	СБР, мЛ	ФСБ-Т, концентрат, мЛ	Дистилл. вода, мЛ
2	0,4	4,0	0,14	2,0	4,0	до 100
3	0,6	6,0	0,21	3,0	6,0	до 150
4	0,8	8,0	0,28	4,0	8,0	до 200
5	1,0	10,0	0,35	5,0	10,0	до 250
6	1,2	12,0	0,42	6,0	12,0	до 300
7	1,4	14,0	0,49	7,0	14,0	до 350
8	1,6	16,0	0,56	8,0	16,0	до 400
9	1,8	18,0	0,63	9,0	18,0	до 450
10	2,0	20,0	0,70	10,0	20,0	до 500
11	2,2	22,0	0,77	11,0	22,0	до 550
12	2,4	24,0	0,84	12,0	24,0	до 600

7.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ СЫВОРОТОК

Готовится за 5–10 мин до начала анализа!

Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для разведения сывороток (РРС). Для этого в отдельную пробирку или лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов внести 90 мкл РРС, добавить 10 мкл ис-

следуемой сыворотки и тщательно перемешать. Образец готов для анализа.

Хранение: в течение 1 часа при 18–25°C.

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА

Рабочий буферный раствор готовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: до 5 суток при 2–8°C.

7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

Готовится за 5–10 мин до начала анализа!

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в ванночку для реагента внести необходимое количество рабочего буферного раствора, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: до 3 часов при 18–25°C.

7.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! *Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Хранение: *не более 3 часов при температуре 18–25°C в темноте.*

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в соответствующие лунки в дублях по 25 мкл каждого калибровочного образца и по 25 мкл контрольного образца.

8.2. В остальные лунки внести в дублях по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в рабочем разведении (п. 7.4.).

8.3. Во все лунки внести по 200 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6.). Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10–15 мин.

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

8.4. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C и 650 об/мин.

8.5. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 5 раз рабочим буферным раствором (п. 7.5.). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидаина (п.7.7.) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения рабочего раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.7. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и тетраметилбензидин, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек.; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 25 мкл калибровочных, контрольного образцов в дублях;
по 25 мкл анализируемых сывороток крови в рабочем разведении в дублях.
- Внести:** по 200 мкл рабочего раствора конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин на шейкере, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** рабочим буферным раствором, по 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с анализируемыми образцами.

11.2. Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации СА 15-3 (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

11.3. Определить содержание концентраций в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации СА 15-3 в образце (см. пример 1).

11.4. Если концентрация СА 15-3 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 250 Ед/мл, образец следует предварительно развести РРС в 20 раз (10 мкл исследуемого образца + 190 мкл РРС), затем, в соответствии с п. 7.4.,

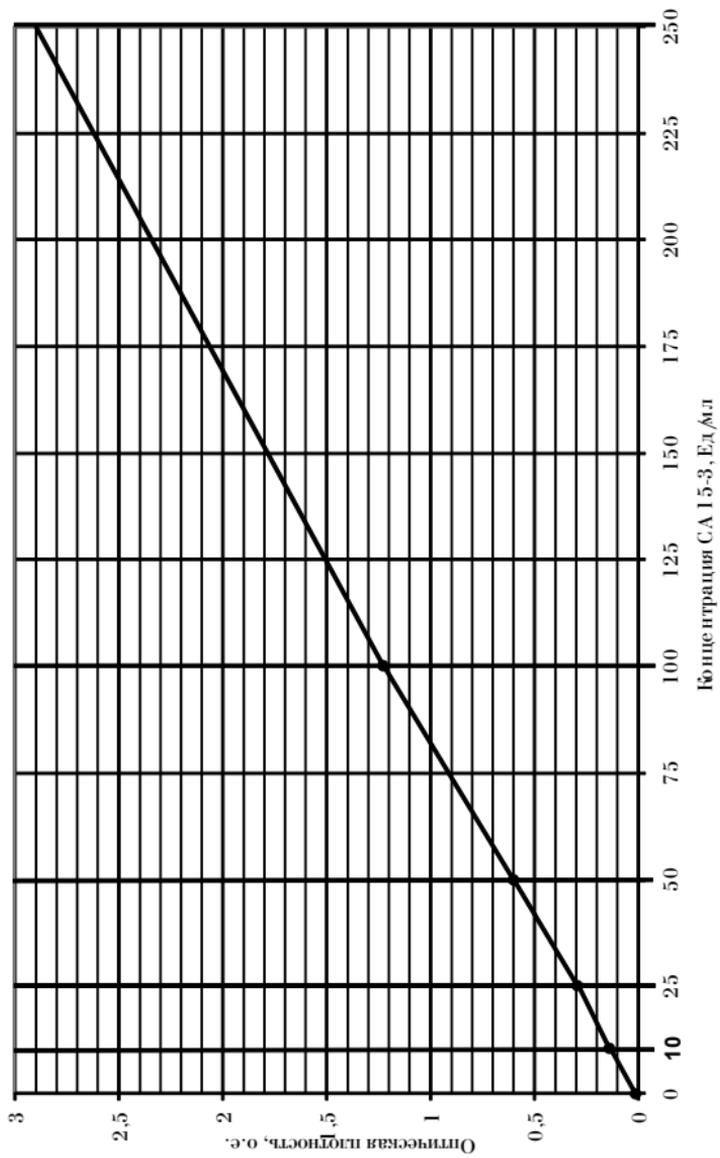


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации СА 15-3. в калибровочных образцах.

Пример 1.

Калибровочная образец, содержащий СА 15-3	Значение ОП о.е.	Конц-ция СА 15-3 (определенная по графику)
250 Ед/мл	2,9	–
100 Ед/мл	1,21	–
50 Ед/мл	0,62	–
25 Ед/мл	0,30	–
10 Ед/мл	0,14	–
0 Ед/мл	0,03	–
Контрольный образец	0,352	30,9 Ед/мл
Анализируемый образец	0,777	63,6 Ед/мл

развести в 10 раз, повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

11.5. Контрольный образец служит для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СА 15-3 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

11.6. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации СА 15-3

в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор реагентов «СА 15-3 – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано в пределах всего срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации СА 15-3 в контрольном образце.

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

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

12.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться:
в лабораторию ИФА гормонов и опухолевых маркеров,
тел. (383) 227-75-41

22.04.10.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru