«**УТВЕРЖДАЮ**"
Генеральный Директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»
_____А.Г. Плехов
«__»_____2023 г.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

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

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ **1 упаковка**

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

КОНЪЮГАТ **1 флакон, 14 мл**

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

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП) **комплект**

Содержат известные количества СА 15-3.

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

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

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

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

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС) **1 флакон, 0,5 мл**

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

БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ **1 флакон, 50 мл**

образцов сыворотки крови,

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р»

РАСТВОР ТМБ **1 флакон, 14 мл**

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ **1 флакон, 14 мл**

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

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР. **1 флакон, 20 мл**

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

Дополнительно в состав набора входят:

- защитная пленка для микропланшетов;
- пакет полиэтиленовый закрывающийся.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

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

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

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

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

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2б.

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.
- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.
- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.
- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл или аналогичные.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

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

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

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азида натрия.

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

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

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

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

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

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

Тщательно перемешать.

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

8.4. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

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

Например:

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

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

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

8.7. Раствор ТМБ готов к использованию.

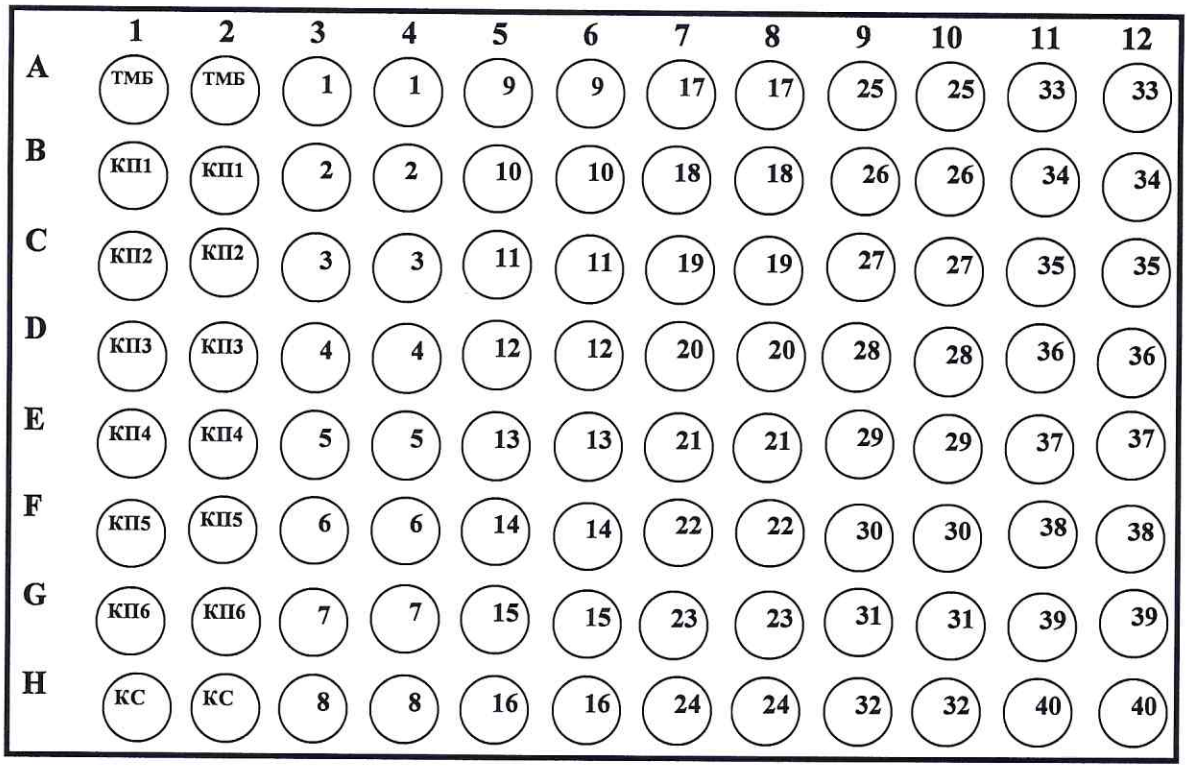
8.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8.9. Буфер Р готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



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

9.3. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 100 мкл Конъюгата.

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

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках А1 и А2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 не превышает 0,1 ед.ОП.

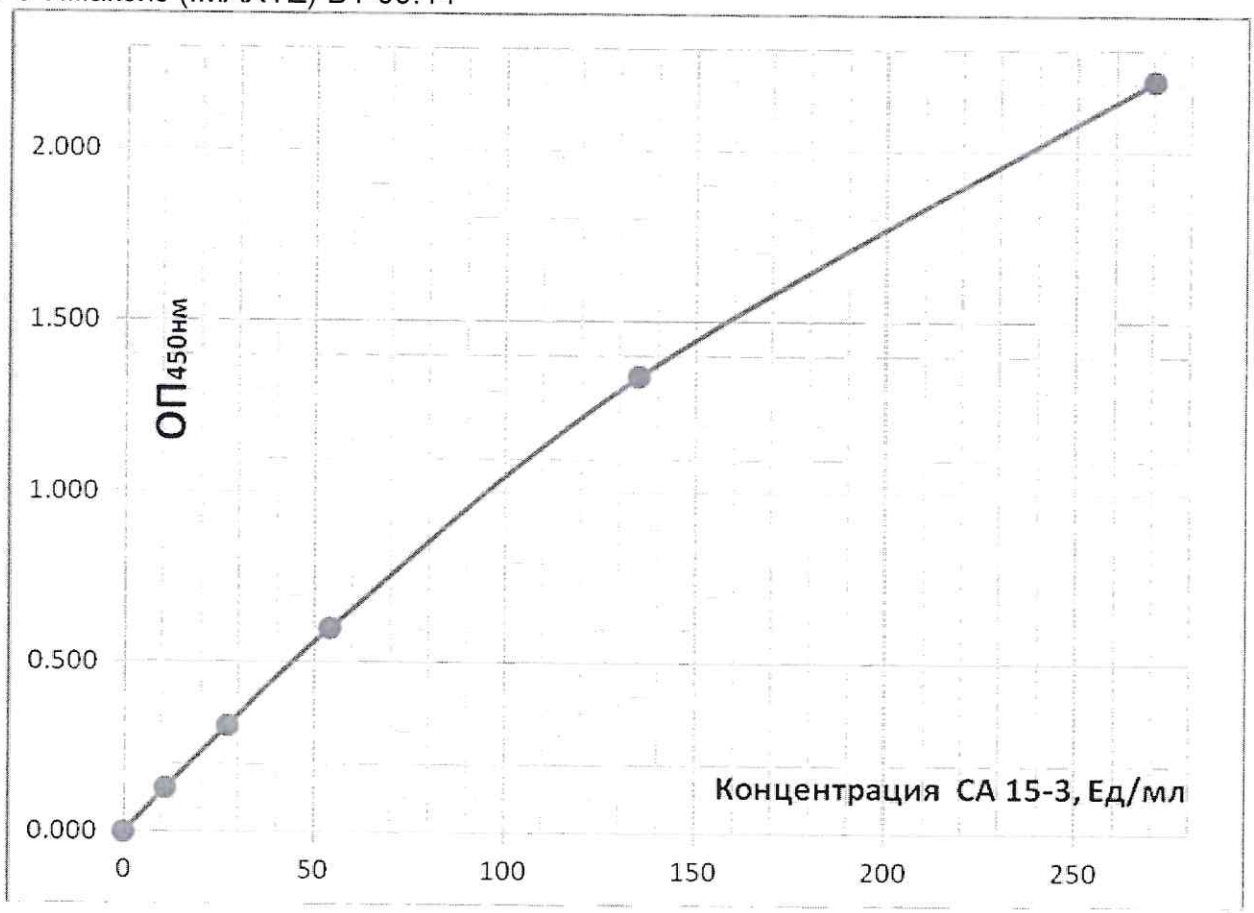
11.2. В линейных координатах построить график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации СА 15-3 в калибровочных пробах (Ед/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре +2...8°С.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

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

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

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

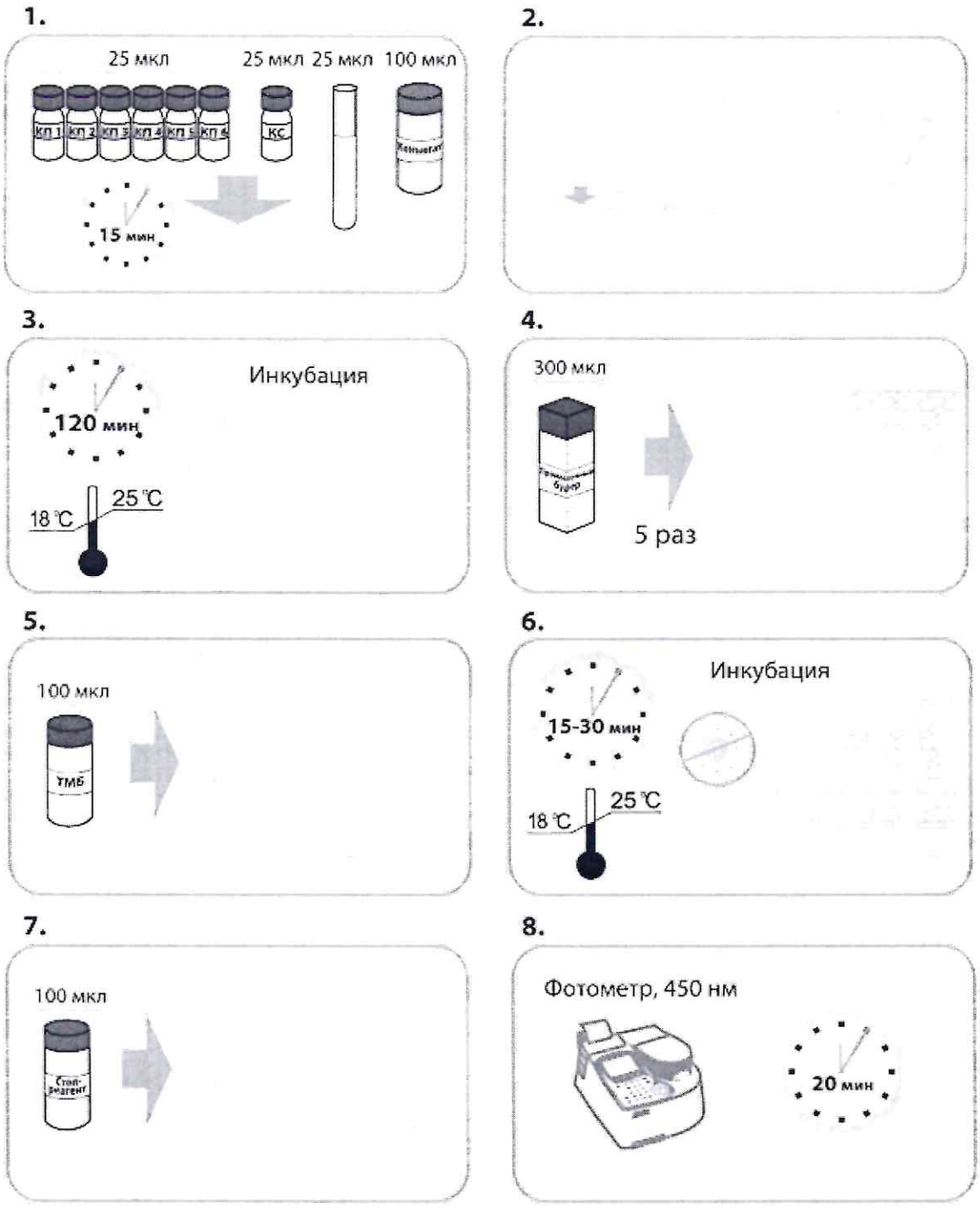
14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 1.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора обращаться в АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194356, Санкт-Петербург, Дорога в Каменку, д. 56, лит. А, тел./факс (812) 250-55-10, 8(800) 200-23-24 или на кафедру КЛД в ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России по адресу: 125284, Москва, 2 Боткинский проезд, д.5. Телефон: +7 (495) 945-82-22.

Генеральный директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» А.Г. Плехов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru