



## LIAISON® S100 (314701) Белок S100B

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение белка S100B в человеческой сыворотке и спинномозговой жидкости методом хемилюминесцентного иммуноанализа (CLIA) с помощью анализаторов линейки LIAISON® с целью мониторинга пациентов со злокачественной меланомой.

### 2. ВВЕДЕНИЕ

Белок S-100B (S-100) принадлежит к суперсемейству кальций-связывающих белков EF-hand S-100-кальмодулин-тропонин-С. Белки S-100 составляют мультигенное семейство низкомолекулярных (9-13 кДа) Ca<sup>2+</sup> -связывающих белков. Первый член семейства S-100 был первоначально выделен Муром (1965) из ткани головного мозга крупного рогатого скота и назван S-100 из-за его растворимости в 100% насыщенном сульфате аммония при нейтральном pH. Биологические свойства различных форм S-100 тесно связаны с метаболизмом Ca<sup>2+</sup> + из-за Ca-связывающих свойств S-100. Связывающие кальций белки участвуют во многих различных видах деятельности, таких как рост и дифференцировка клеток, энергетический обмен, структура клеток и внутриклеточная сигнальная трансдукция.

До настоящего времени было идентифицировано 20 различных белков S-100 на основе структурного и функционального сходства. Белок S-100B существует в двух разных димерных формах S-100A1B и S-100BB, состоящих из субъединиц S-100A1 (93 остатка) и S-100B (91 остаток).

Белки S-100 показывают специфическую картину тканевого и клеточного распределения. S-100B наиболее распространен в глиальных и шванновских клетках центральной и периферической нервной системы, а также хорошо экспрессируется в меланоцитах, адипоцитах и хондроцитах. S-100A1 обнаружен в астроцитах, нейронах, поперечно-полосатых мышцах, сердце и почках.

Злокачественная меланома является злокачественным новообразованием меланоцитов. Из-за высокой концентрации S-100B в злокачественных меланоцитах S-100B оценивали как маркер злокачественной меланомы. В большом количестве публикаций было продемонстрировано, что S-100B является надежным маркером опухоли, главным образом, при метастатической меланоме, где он отражает опухолевую нагрузку и прогноз. Количество пациентов с меланомой, имеющих положительные значения S-100B, увеличивается со стадией опухоли, и повышенные уровни S-100B обнаруживаются примерно у 68-92% пациентов с болезнью стадии IV. Также было описано, что S-100B является ценным маркером для мониторинга и наблюдения за пациентами с меланомой. Мониторинг прогрессирования заболевания имеет решающее значение в ведении заболевания. S-100B следует за течением заболевания и, как было показано, является ранним индикатором рецидива. Поэтому он может быть ценным дополнением к визуализации и клинической оценке.

Другим важным клиническим применением S-100B является маркер для различных форм поражений головного мозга. Клинические исследования показали немедленное увеличение S-100B в кровотоке после травмы головного мозга, что указывает на быстрое выделение S-100B головного мозга в кровь. Однако механизм высвобождения белка S-100B еще не полностью изучен.

S-100B является очень чувствительным маркером травмы головного мозга, вызванной травмой головы, и выделяется во время первичной травмы. Уровень в сыворотке крови сильно коррелирует с тяжестью первичной травмы и исходом пациента. Сообщалось, что у пациентов с глобальной церебральной ишемией положительное значение в сыворотке через 24 часа после ишемии является независимым предиктором неспособности прийти в сознание. Также было показано, что S-100B является полезным маркером при инсульте и асфиксии при родах.

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод количественного определения S100B представляет собой 2-ступенчатый хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA) по принципу сэндвича. Два разных типа высоко специфичных мышиных моноклональных антител к S100B связаны с магнитными микрочастицами (твердая фаза), антитела третьего типа мечены производным изолюминола (конъюгат антител с красителем). Во время первой инкубации молекулы S100B, присутствующие в калибраторах, контролях и пробах, связываются с антителами твердой фазы. Во время второй инкубации образовавшийся комплекс взаимодействует с антителами, мечеными изолюминолом. Сэндвич образуется только при наличии в пробе молекул S100B. После каждой инкубации не связавшиеся молекулы удаляются во время цикла промывки. Затем к реакционной смеси добавляются реактивы для активации, индуцирующие хемилюминесцентную реакцию. Интенсивность люминесценции, измеряемая с помощью фотоумножителя в относительных единицах интенсивности, отражает концентрацию S100B в калибраторах, контролях и пробах пациентов.

#### 4. СОСТАВ НАБОРА

Магнитные частицы (2,3 мл)	Магнитные частицы, покрытые мышиными моноклональными антителами к S100B; фосфатный буфер; БСА; азид натрия.
Раствор для разведения образцов (4 мл)	Буфер (только для спинномозговой жидкости).
Конъюгат (23 мл)	Мышиные моноклональные антитела к S100B, меченные производным изолюминола (аминобутилэтилизолуминолом); фосфатный буфер; БСА; азид натрия.
Буфер (14 мл)	Фосфатный буфер; БСА; азид натрия.
Количество определений	100

Все реагенты готовы к использованию. Порядок расположения реактивов в таблице отражает их расположение в картридже реактивов.

#### Необходимые материалы, не входящие в набор

Анализатор LIAISON® XL	Анализатор LIAISON®
Кюветы (каталожный номер X0016). Одноразовые наконечники (каталожный номер X0015). Набор запускающих реактивов XL(каталожный номер 319200).  Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100). Мешки для отходов XL (каталожный номер X0025)	Реакционные модули (каталожный номер 319130).  Набор запускающих реактивов (каталожный номер 319102) или набор запускающих реактивов XL (каталожный номер 319200). Реактив для ежедневной проверки анализатора (каталожный номер 319150). Системная / промывочная жидкость (каталожный номер 319100). Мешки для отходов (каталожный номер 450003). Набор растворов для обслуживания анализатора (каталожный номер 310990).

#### Дополнительные материалы, рекомендованные для работы

Контроль S100B (каталожный номер 319112)

Калибраторы S100B (низкий/высокий) (каталожный номер 319117) Поставляются ТОЛЬКО с набором LIAISON® S100

#### 5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Только для *In vitro* диагностики.

Все образцы человеческой сыворотки/плазмы, использованные для производства набора, были протестированы на наличие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2, а также HBs-антигена и были признаны отрицательно реагирующими в вышеуказанных тестах. Но, поскольку не существует метода исследований, который бы гарантировал полную инфекционную безопасность биоматериалов человеческого происхождения, рекомендуется обращаться с набором, как с потенциально инфекционным.

#### 6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не употребляйте пищу, напитки, не курите и не наносите косметику в лаборатории, где проводятся анализы.

Не пипетируйте растворы ртом.

Избегайте прямого контакта со всеми потенциально инфекционными материалами, надевая защитную одежду, такую как лабораторные халаты, защитные очки и одноразовые перчатки. В конце каждого анализа тщательно мойте руки.

Избегайте всплесков или образования аэрозолей. Любую утечку биологического реагента следует смыть с помощью раствора гипохлорита натрия с 0,5%-ным активным хлором и утилизировать как инфекционные отходы.

Все образцы и реагенты, содержащие биологические материалы, используемые в анализе, должны считаться потенциально способными передавать инфекционные агенты. С отходами следует обращаться с осторожностью и утилизировать их в соответствии с лабораторными нормами и нормами законов, действующими в стране. Любые материалы, подлежащие повторному использованию, должны быть надлежащим образом стерилизованы в соответствии с местными законами и нормами.

Проверяйте эффективность цикла стерилизации/обеззараживания.

Реагенты, содержащие азид натрия (<0,1 %) [ЕС №247-852-1]:

<b>DIRECTIVE</b>	<b>EC No. 1272/2008</b>
<b>HAZARD / RISK STATEMENTS</b>	<b>EUH 210 - Safety data sheet available on request</b>

#### 7. ПОДГОТОВКА ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ

##### 7.1 Интегральный картридж реактивов.

Пожалуйста, обратите внимание на следующие важные меры предосторожности при работе с реагентами:

##### Ресуспендирование магнитных частиц

Магнитные частицы должны быть полностью ресуспендированы до того, как интеграл будет помещен в прибор. Чтобы

обеспечить полное ресуспендирование частиц, выполните следующие действия:

Перед удалением алюминиевых мембран с флаконов, проверните колесо флакона с магнитными частицами, пока цвет суспензии не станет равномерно коричневым. Аккуратно перемешайте их содержимое, держа интеграл горизонтально, чтобы избежать пенообразования. Осмотрите нижнюю часть флакона, чтобы убедиться, что все магнитные частицы были ресуспендированы.

При необходимости повторите процедуру до полного ресуспендирования магнитных частиц.

После удаления алюминиевой мембраны тщательно протрите поверхность каждого флакона для удаления остатков жидкости, если необходимо.

### **Вспенивание реагентов**

Чтобы обеспечить оптимальные рабочие характеристики интеграла, следует избегать пенообразования реагентов.

Придерживайтесь приведенных ниже рекомендаций по предотвращению вспенивания:

Перед использованием интеграла осмотрите реагенты, чтобы убедиться в отсутствии пены. Если после ресуспендирования магнитных частиц пена появилась, поместите интеграл в анализатор и подождите, пока пена исчезнет. Интеграл готов к использованию только тогда, когда пена исчезла, а интеграл с ресуспендированными частицами находится на борту.

### **Установка интеграла в область загрузки реактивов**

#### **Анализатор LIAISON®**

- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 30 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

#### **Анализатор LIAISON® XL**

- Анализатор LIAISON® XL оснащен встроенным твердотельным магнитным устройством, которое помогает ресуспендировать микрочастицы до размещения интеграла с реагентами в области загрузки реактивов анализатора. Для уточнения деталей обратитесь к руководству по эксплуатации анализатора.
  - а. Вставьте интеграл с реагентами в специальный разъем.
  - б. Оставьте интеграл с реагентами в твердотельном магнитном устройстве, по крайней мере, на 30 секунд (допускается до нескольких минут). Повторите по мере необходимости.
- Установите интеграл в область загрузки реактивов анализатора так, чтобы штрих-код был расположен слева, и оставьте для перемешивания магнитных частиц в течение 15 минут. Анализатор автоматически перемешивает и полностью ресуспендирует магнитные частицы за это время.
- Следуйте инструкции по эксплуатации анализатора для загрузки проб и начала исследования

### **7.2 Контроли**

Для правильной хранения, подготовки и постановки и набора контрольных материалов LIAISON® Control S100 Set следовать соответствующей инструкции.

### **7.3 Калибраторы**

Для правильной хранения, подготовки и постановки и набора калибраторов LIAISON® S100 Cal (low/high) Set следовать соответствующей инструкции.

**ВНИМАНИЕ:** Набор LIAISON® S100 Kit (каталожный номер 314701) может быть использован совместно с набором калибраторов LIAISON® S100 Cal (low/high) (каталожный номер 319117). Не использовать с другими лотами.

## **8. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ИНТЕГРАЛЬНОГО КАРТРИДЖА РЕАКТИВОВ**

**Всегда храните интегралы в вертикальном положении, в противном случае последующее перемешивание магнитных частиц будет затруднено. Избегайте попадания прямых солнечных лучей.**

Невскрытые реактивы стабильны до окончания срока годности при условии их хранения в вертикальном положении при температуре 2-8°C. Запрещается замораживать реактивы, входящие в состав картриджа. Запрещается использовать интеграл после окончания срока годности, указанного на этикетке интеграла. После вскрытия интеграла (удаления алюминиевых мембран) его содержимое стабильно в течение не менее **2 недель** при условии хранения при температуре 2-8°C в холодильнике или на борту анализатора.

## **9. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Сыворотка, спинномозговая жидкость. Запрещается использовать в качестве пробы плазму с ЭДТА.

**Сыворотка должна быть отделена от клеток после забора крови как можно скорее:** коагуляция крови не более 20-30 минут при комнатной температуре, центрифугирование в течение 10 минут при 800-1000 гpm. Мутные, липемичные пробы, а также пробы с твердыми частицами и дебрисом эритроцитов перед исследованием могут потребовать дополнительной очистки путем фильтрации или центрифугирования. Не рекомендуется исследовать сильно гемолизированные и липемичные пробы, а также пробы с признаками бактериальной контаминации. Перед установкой пробы в анализатор необходимо удалить все пузыри с ее поверхности.

Стабильность: 24 часа при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения пробы должны быть заморожены при температуре -20°C или ниже. После разморозки пробу необходимо аккуратно перемешать. Избегайте повторного замораживания пробы.

Минимально необходимый объем 250 µл (100 µл на исследование + 150 µл мертвый объем).

## 10. КАЛИБРОВКА

Исследование калибраторов (каталожный номер 319117) позволяет перекалибровать мастер-кривую, хранящуюся в памяти анализатора, с использованием значений концентрации калибраторов, зашифрованных в штрих-коде этикетки интеграла. Калибраторов достаточно для проведения 4 калибровок.

Калибровка должна быть проведена в двух повторах в следующих случаях:

- Используется новая серия набора реактивов или набора запускающих реактивов.
- Прошло более 14 дней с момента последней калибровки.
- Используется новый набор реактивов.
- Было проведено обслуживание анализатора.
- Результаты исследования контрольных сывороток выходят за пределы допустимого диапазона.

Анализатор LIAISON®: значения концентраций калибратора содержатся в штрих-коде интеграла.

Анализатор LIAISON® XL: значения концентраций калибратора содержатся в радиочастотной метке.

## 11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Строгое следование рекомендациям инструкции пользователя гарантирует получение корректных результатов.

**Анализатор LIAISON®.** Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в штрих-коде этикетки интеграла. Если информации с штрих-кода не читается, то картридж является непригодным к использованию. Не утилизируйте реагентный интеграл и свяжитесь с региональными представителями DiaSorin для получения дальнейших инструкций.

Процедура анализа, выполняемого анализатором, состоит из следующих стадий:

1. Добавление буфера А кюветы реакционного модуля.
2. Раскапывание калибраторов, контролей или проб.
3. Добавление магнитных частиц.
4. Инкубация.
5. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
6. Добавление конъюгата.
7. Инкубация.
8. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
9. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности свечения.

**Анализатор LIAISON® XL.** Для идентификации каждой методики используется информация, зашифрованная в радиочастотной метке интеграла. Если информации с радиочастотной метки не читается, то картридж является непригодным к использованию. Не утилизируйте реагентный интеграл и свяжитесь с региональными представителями DiaSorin для получения дальнейших инструкций.

Процедура анализа, выполняемого анализатором, состоит из следующих стадий:

1. Раскапывание калибраторов, контролей или проб в кюветы.
2. Добавление буфера А и магнитных частиц.
3. Инкубация.
4. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
5. Добавление конъюгата.
6. Инкубация.
7. Промывка Системной/промывочной жидкостью.
8. Добавление запускающих реактивов и измерение интенсивности свечения.

## 12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна установить частоту проведения контроля качества самостоятельно.

Для контроля качества необходимо использовать контроль производства компании DiaSorin или другой коммерческий контроль:

- а. по меньшей мере 1 раз в день перед постановкой проб пациентов
- б. каждый раз при использовании нового реагентного картриджа
- в. Каждый раз после калибровки набора
- г. каждый раз при использовании нового лота Starter Kit
- д. для того, чтобы оценить адекватность работы открытого интеграла через 2 недели в соответствии с руководящими принципами или требованиями местных нормативных актов или аккредитованных организаций.

Контроли LIAISON® следует ставить в 1 повторности для контроля эффективности анализа. Контрольные значения должны лежать в пределах ожидаемого диапазона: всякий раз, когда один или оба контроля находятся за пределами ожидаемых диапазонов, следует провести калибровку и повторить тестирование контроля. Если контрольные значения, полученные после успешной калибровки, повторно выходят за пределы предварительно определенных диапазонов, тестирование следует повторить с использованием неоткрытого контрольного флакона. Если контрольные значения лежат вне ожидаемых диапазонов, результаты не должны сообщаться пациенту. Эффективность других контролей должна оцениваться на совместимость с данным анализом перед их использованием. Затем следует установить соответствующие диапазоны значений для используемых материалов контроля качества.

### 13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализатор автоматически рассчитывает концентрацию S100B в  $\mu\text{г/л}$ . За более подробной информацией обратитесь к Инструкции пользователя. Результаты измерений калибраторов и контролей анализаторами LIAISON® и LIAISON® XL в относительных световых единицах (RLU) или концентрационных единицах могут различаться, но результаты анализов проб пациентов будут одинаковыми.

#### 13.1 Диапазон исследования

До 30  $\text{мкг/л}$  белка S100.

#### 13.2 Референсные границы

Исследование с помощью набора реактивов LIAISON® S100 проб здоровых мужчин и женщин показало, что нормальные значения концентрации белка S100B составляют 0-0,15  $\text{мкг/л}$  в сыворотке и ниже 2,7  $\text{мкг/л}$  в спинномозговой жидкости (95%-я перцентиль).

### 14. ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагенты следует использовать только в семействе анализаторов LIAISON®

Отдельные компоненты интеграла реагента не должны быть удалены из интеграла.

Этот комплект нельзя использовать после истечения срока годности, указанного на этикетке упаковки. Строгое следование инструкциям к прибору и реактиву необходимо для получения достоверных результатов. Бактериальная контаминация или нагревание пробы могут повлиять на результат исследования.

Пробы пациентов, получающих препараты мышиных моноклональных антител в целях терапии или диагностики, могут содержать анти-мышиные антитела (НАМА). Результаты исследования таких проб с помощью иммунологических методик, основанных на использовании моноклональных антител, могут быть завышены или занижены. Несмотря на то, что НАМА-нейтрализующие компоненты входят в состав реактивов, слишком высокие концентрации НАМА могут случайным образом исказить результаты измерений.

Концентрация S100B в крови пациентов со злокачественной меланомой может лежать в нормальном диапазоне.

Интерпретация результатов определения S100B может проводиться только вместе с данными истории болезни и других диагностических исследований.

Запрещается обмениваться интегралами между анализаторами LIAISON® и LIAISON® XL. Интеграл, однажды установленный на анализатор определенного типа, должен использоваться на этом анализаторе до самого конца. Запрещается оценивать динамику концентрации по результатам, полученным на разных типах анализаторов. Такие измерения должны быть выполнены на одном конкретном типе анализатора (либо LIAISON®, либо LIAISON® XL).

### 15. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 15.1 Аналитическая специфичность.

Аналитическую специфичность можно определить, как способность теста безошибочно выявлять специфический аналит в присутствии потенциально мешающих факторов в матриксе пробы (например, гемолиза, результата обработки пробы).

**15.2 Интерференция:** контролируемые исследования потенциально мешающих факторов или условий продемонстрировали, что характеристики теста не менялись в присутствии гемолиза (вплоть до концентрации гемоглобина 125  $\text{мг/дл}$ ), липемии (вплоть до концентрации триглицеридов 30  $\text{мг/мл}$ ), билирубинемии (вплоть до концентрации билирубина 0,2  $\text{мг/мл}$ ).

#### 15.3 Точность при исследовании на анализаторе LIAISON®

Различные пробы, содержащие разные концентрации специфического аналита, были проанализированы с целью определения повторяемости и воспроизводимости теста (то есть вариабельности внутри серии и между сериями).

Вариация внутри серии			Вариация между сериями		
Среднее значение ( $\text{мкг/л}$ )	КВ (%)	Кол-во	Среднее значение ( $\text{мкг/л}$ )	КВ (%)	Кол-во
0,11	6,4	5	0,13	8,5	21
0,31	3,1	5	0,27	9,3	21
1,60	2,8	5	1,82	5,7	25
2,60	3,9	5	2,95	7,6	26
9,90	2,8	5	7,67	6,7	25
18,40	3,6	5	18,40	5,6	27

#### 15.4 Точность при исследовании на анализаторе LIAISON® XL

Различные пробы, содержащие разные концентрации специфического аналита, были проанализированы с целью определения повторяемости и воспроизводимости теста (то есть вариабельности внутри серии и между сериями).

Вариация внутри серии			Вариация между сериями		
Среднее значение ( $\text{мкг/л}$ )	КВ (%)	Кол-во	Среднее значение ( $\text{мкг/л}$ )	КВ (%)	Кол-во
0,14	3,2	20	0,12	4,3	20
0,33	2,9	20	0,82	2,5	20
1,71	2,6	20	3,53	3,4	20

5,59	2,5	20	13,29	4,2	20
------	-----	----	-------	-----	----

### 15.5 Правильность исследования

Правильность исследования была определена с помощью теста разведения и восстановления.

### 15.6 Тест разведения.

Пробы (СМЖ) с высокой концентрацией S-100 были исследованы перед и после разведения. Результаты были проанализированы с помощью метода линейной регрессии. Дилуэнт LIAISON® S100 может быть использован только для разведения образцов с высокой концентрацией S100 в СМЖ. Образцы сыворотки должны разводиться сывороткой с низким титром S100 (не поставляется в наборе).

В таблице представлены примеры разведения сывороткой с низким титром S100. Начальная концентрация 10,7 мкг/л.

Разведение	Полученные значения (мкг/л)	Ожидаемые значения (мкг/л)	Восстановление (%)
1:2	5,94	5,39	110
1:4	2,98	2,74	109
1:8	1,48	1,41	105
1:16	0,85	0,75	113
1:32	0,46	0,42	109

В таблице представлены примеры разведения СМЖ дилуэнт. Начальная концентрация 2,176 мкг/л.

Разведение	Полученные значения (мкг/л)	Ожидаемые значения (мкг/л)	Восстановление (%)
1:2	1,21	1,09	111
1:4	0,60	0,54	111
1:8	0,28	0,27	104
1:16	0,14	0,14	100
1:32	0,07	0,07	100

### 15.7 Тест восстановления.

Пробы с внесением S100 были исследованы с помощью LIAISON® S100.

В таблице представлены результаты восстановления проб пациентов (0,14 мкг/л) с разным внесением S100.

Полученные значения (мкг/л)	Ожидаемые значения (мкг/л)	Восстановление (%)
0,80	0,83	97
1,63	1,74	93
3,34	3,35	100
9,48	10,38	91

### 15.8 Эффект высокой дозы

Эффекта насыщения не наблюдалось до концентрации белка S100 2400 мкг/л.

При исследовании проб с крайне высокой концентрацией аналита, может наблюдаться эффект занижения результатов за счет влияния эффекта насыщения. Оценка влияния эффекта насыщения была проведена путем исследования пяти высококонцентрированных свободным S-100-смешанных образцов. Результат анализа, как и ожидалось, превышал верхнюю границу измеряемого диапазона и, значит, не привел к ошибочной классификации пробы.

### 15.9 Аналитическая чувствительность:

определенная как минимальная концентрация от 0 с 2 стандартными отклонениями составила менее  $\leq 0,02$   $\mu\text{г/л}$ .