

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации опухолевого маркера НЕ4 в сыворотке крови
(НЕ4-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации опухолевого маркера НЕ4 в сыворотке крови «НЕ4-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации опухолевого маркера НЕ4 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. НЕ4 – человеческий эпидидимальный секреторный белок 4 (молекулярная масса 25 кД). НЕ4 экспрессируется на низком уровне в нормальном эпителии репродуктивных органов, верхних дыхательных путей и поджелудочной железы. Повышенная продукция НЕ4 выявляется при наличии опухолей яичников. При развитии опухолей концентрация НЕ4 в сыворотке крови повышается и достаточно точно отражает состояние злокачественного процесса.

1.3. Количественное определение содержания НЕ4 в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики эпителиальных опухолей яичников и динамического контроля его уровня с целью оценки эффективности проводимой терапии, а также прогнозирования течения заболевания.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения НЕ4 основан на одностадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием двух типов моноклональных антител к моле-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД

Электронная копия оформлена Центром испытаний и регистрации медицинских изделий Лабораторией Н.Н. Сорокиной.

куле HE4.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации происходит связывание сывороточного HE4 с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и моноклональными антителами к HE4, конъюгированными с пероксидазой.

Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окрашивания пропорциональна концентрации HE4 в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрации HE4 в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к HE4 человека, готовый для использования – 1 шт.;

- калибровочные образцы, содержащие известные количества HE4 – 0, 25, 100, 250, 500, 1000 пмоль/л, аттестованные относительно стандартов «CanAg HE4 EIA» (фирма Fujirebio Diagnostics AB, Швеция); концентрации HE4 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; лиофилизированные – 6 флаконов;

- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием HE4, аттестованный относительно стандартов «CanAg HE4 EIA» (фирма Fujirebio Diagnostics AB, Швеция); лиофилизированный – 1 флакон;

- конъюгат моноклональных антител к HE4 с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (23 мл);

- раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) – 1 флакон (5,0 мл);

- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);

- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- плёнка для заклеивания планшета – 1 шт.;

- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 2 шт.;
- наконечники для дозатора на 2-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

3.2. Хук-эффект высоких концентраций при исследовании сывороток крови не был обнаружен до концентрации НЕ4 30 000 пмоль/л.

3.3. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в сыворотках крови, содержащих гетерофильные, в том числе антимышьиные (НАМА), антитела.

3.4.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания НЕ4 в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.5.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации НЕ4 при разведении калибровочных образцов, содержащих 1000, 500, 250 пмоль/л НЕ4, в 2 раза и калибровочного образца 100 пмоль/л НЕ4 – в 4 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.6.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации НЕ4 предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 100 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.7.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация НЕ4 рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 1,5 пмоль/л.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация НЕ4, измеренная в сыворотке крови 360 здоровых женщин в возрасте 18-50 лет, не превышала 150 пмоль/л.

3.9. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации НЕ4, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздража-

ющим 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 исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение

при длине волны 450 нм;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;

- таймер;

- промывочное устройство для планшетов;

- холодильник бытовой;

- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкости от 5 до 350 мкл;

- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;

- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

- перчатки медицинские диагностические одноразовые;

- бумага фильтровальная;

- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

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

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток или при температуре минус 20 °C (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25 °C в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета.

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

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

В каждый флакон с калибровочными и контрольным образцами внести по 500 мкл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО). Выдержать при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 мин до полного растворения содержимого, осторожно перемешать, избегая образования пены.

Хранение: в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 недель; при температуре минус 20 °С и ниже – в течение всего срока годности. Допускается пятикратное замораживание и размораживание образцов.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в чистый флакон или ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: после первого вскрытия флакона при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс (раствора ТМБ плюс).

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в чистый флакон или ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: после первого вскрытия флакона при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	3,6	2,0
3	6,0	до 150	5,5	3,0
4	8,0	до 200	7,0	4,0
5	10,0	до 350	9,0	5,0
6	12,0	до 300	11,0	6,0
7	14,0	до 350	12,0	7,0
8	16,0	до 400	14,0	8,0
9	18,0	до 450	16,0	9,0
10	20,0	до 500	18,0	10,0
11	22,0	до 550	20,0	11,0
12	24,0	до 600	22,0	12,0

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 25 мкл каждого калибровочного образца и по 25 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

8.4. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл промывочного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.6) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации HE4 в калибровочных образцах (пмоль/л).

9.3. Определить концентрацию HE4 в контрольном образце и анализируемых образцах

по калибровочному графику.

9.4. Если концентрация НЕ4 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 1000 пмоль/л, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

9.5. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации НЕ4 в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации НЕ4 в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- приготовленные калибровочные и контрольный образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 недель; при температуре минус 20 °С и ниже – в течение всего срока годности. Допускается пятикратное замораживание и размораживание образцов;

- конъюгат, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации НЕ4 в контрольном образце.

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

10.7. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «НЕ4-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 363-20-60, 227-75-43, тел./факс (383) 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Зав. лабораторией НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

Ректор ФГБОУ ВО БГМУ

Минздрава России,

член-корреспондент РАН, профессор

В.Н Павлов

М.П.

«13» июня 2017 г.



Ведущий исследователь

В.Н.С. член ФГБОУ ВО БГМУ из РФ

Исследован И.Ф.



Подпись:

I.F. Izraelson

секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
России

подпись

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 11 листе
Ректор ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
и член-корреспондент РАН, профессор

Павлов В.И.
2017 г.



06

