

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

А.С. Хусаинов

« 27 » 014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации ракового эмбрионального антигена
в сыворотке крови
(РЭА-ИФА-БЕСТ)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «РЭА-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации ракового эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Раковый эмбриональный антиген представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 175000–200000 Да. РЭА является опухолево-эмбриональным антигеном, вырабатывается в тканях пищеварительного тракта эмбриона и плода и определяется в сыворотке крови плода. При развитии опухолей концентрация РЭА в сыворотке крови повышается и достаточно точно отражает состояние злокачественного процесса.

1.3. Количественное определение содержания РЭА в сыворотке крови человека имеет диагностическое значение и может быть использовано для мониторинга терапии, выявления рецидивов и недиагностируемых метастазов рака различных локализаций и органной специфичности (опухоли толстой и прямой кишки, легких, молочной железы, желудка), а также для прогноза развития опухоли.

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

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и н.с. Алексеенко Е.Н.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к РЭА.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации происходит связывание РЭА с моноклональными антителами к РЭА, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и с моноклональными антителами к РЭА, конъюгированными с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина плюс происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации РЭА в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация РЭА в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к РЭА человека, готовый для использования – 1 шт.;
 - калибровочные образцы, содержащие известные количества РЭА – 0; 55; 110; 220; 440 и 880 мМЕ/мл, аттестованные относительно 1st International Reference Preparation (IRP) NIBCS 73/601; концентрации РЭА в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 фл. (по 0,5 мл);
 - контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием РЭА, аттестованный относительно 1st International Reference Preparation (IRP) NIBCS 73/601, готовый для использования – 1 фл. (0,5 мл);
 - конъюгат моноклональных антител к РЭА с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл. (23,0 мл);
 - раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12,0 мл);
 - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28,0 мл);
 - раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);
 - стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).
- Набор дополнительно комплектуется:
- плёнкой для заклеивания планшета – 2 шт;

- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт;
- ванночкой для реагента – 2 шт;
- наконечниками для пипетки на 5 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе моноклональные антитела обеспечивают специфическое взаимодействие с РЭА. Не обнаружено перекрёстной реакции моноклональных антител с другими онкомаркерами: АФП, ПСА, СА-125, СА 15-3, СА 19-9.

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

3.3. * Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации РЭА в лунках, содержащих контрольный образец не превышает 8%.

3.4. * Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации РЭА при разведении калибровочных образцов, содержащих 880; 440; 220; 110 мМЕ/мл, в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.5. * Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации РЭА, предписанной в образце, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 110 мМЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.6. * Чувствительность. Минимально определяемая концентрация РЭА, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 , плюс 2σ (σ - среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0) не превышает 3,3 мМЕ/мл.

3.7. «Хук»-эффект высоких концентраций.

«Хук»-эффект отсутствует в диапазоне концентраций РЭА от 0 до 44000 мМЕ/мл.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация РЭА, измеренная в сыворотке крови, взятой у 168 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет, не превышала 55 мМЕ/мл.

3.9. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации РЭА, 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 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 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 инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекции,

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. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить 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

- 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 620-655 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;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости от 5 до 350 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. 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. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18-25 °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, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

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.

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

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

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений. Перед использованием встряхнуть.

После первого вскрытия калибровочные и контрольный образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

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

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

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

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре

от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

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

7.7. Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия можно хранить 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, 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	до 250	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

7.8. Внести в соответствующие лунки в дубликатах 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 15 мин.

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

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые накопечники.

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

7.11. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным

опорожнением лунок после каждого цикла отмытки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.6)

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

7.13. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

7.14. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. 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 - 650 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

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

9.3. Определить содержание РЭА в контрольном образце и анализируемых пробах по калибровочному графику. Вычислить среднее арифметическое значение концентрации для каждой пары лунок, содержащих анализируемые образцы. В случае дополнительного разведения анализируемых образцов полученную концентрацию РЭА необходимо умножить на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов «РЭА-ИФА-БЕСТ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25 °C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. 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 °C в течение всего срока годности;
- калибровочные образцы, контрольный образец, конъюгат после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток (PPC), раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;
- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток;
- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации РЭА в контрольном образце.

10.3. Если концентрация РЭА в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 880 мМЕ/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл PPC), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

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

10.5. 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 «РЭА-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в
ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-
Бест», тел. тел. (383) 363-20-60, тел./факс (383) 363-35-55.

Зав. лабораторией НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России,
д.м.н., профессор
м.п.



В.В. Долгов

«___» _____ 201_ г.

10 ФЕВ 2015



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
десять листов

М.И.С.