

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
Ю. С. Лебедин
« » 2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения антигена НЕ4 в сыворотке (плазме) крови «НЕ4-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «НЕ4-ИФА» предназначен для *ин vitro* определения антигена НЕ4 в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. НЕ4 – новый онкомаркер для раннего выявления рака яичников и контроля эффективности лечения пациенток с эпителиальным раком яичников. Рак яичников- ведущая причина смерти от гинекологической онкологии. Установлено, что если карцинома яичника диагностируется на ранней стадии заболевания, то прогноз благоприятный, так как заболевание может быть вылечено до распространения онкопроцесса в окружающие ткани. Однако, к сожалению, рак яичников почти в 80% случаев диагностируется в III и IV стадиях заболевания. В связи с этим, в подавляющем большинстве случаев отмечаются рецидивы онкопроцесс в течение последующих 5 лет. Данная печальная статистика объясняет усиленное внимание ученых, сфокусированное на создании новых диагностических тестов для выявления рака яичников и его рецидивов на ранних стадиях. Маркер НЕ4 является более специфичным и чувствительным по сравнению широко используемым в гинекологической онкодиагностике маркером СА-125. Доказано, что комбинация этих двух тестов более чувствительна, чем каждый маркер в отдельности, чувствительность такого определения достигает 76%, а специфичность- 95%. Кроме того, НЕ4 показателен как онкомаркер при аденокарциноме матки. Результаты лабораторных методов обследования должны трактоваться в сочетании с другими клиническими данными.

Положительный результат анализа не может служить основанием для постановки диагноза и должен использоваться в комплексе с клиническим наблюдением и другими методами диагностики

1.4. Диагностическая значимость определения.

Определение уровня антигена НЕ4 в сыворотке (плазме) крови используется для мониторинга и диагностики онкологических процессов различной этиологии.

1.5. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение антигена НЕ4 основано на использовании

«сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к антигену HE4. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации одновременно происходит связывание антигена HE4, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к антигену HE4 с пероксидазой.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание содержимого лунок. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена HE4 в исследуемом образце. Концентрацию антигена HE4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (ОП₄₅₀) от содержания антигена HE4 в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными анти-HE4 антителами; готов к использованию - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе TRIS-Буфера (pH 7,2-7,4), содержащие известные количества антигена HE4 - **0; 25; 50; 100; 200 и 400 Ед/мл**; содержание антигена HE4 в калибровочных пробах может несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 6 пробирок или флаконов (по 0,8 мл каждая); калибровочная проба 0 Ед/мл - 6,0 мл;
- **конъюгат**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антигена HE4; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- **аналитический паспорт**;
- **Инструкция по применению Набора.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1.. Специфичность на сыворотках панели производителя.

При проверке на панели предприятия (СПП № 239 «Сыворотки крови человека, содержащие и не содержащие антиген HE4», утвержденной генеральным директором



ООО «ХЕМА» 10.01.2012 г.), состоящей из 30 нативных образцов сыворотки и плазмы крови человека, достоверно содержащих и не содержащих антиген HE4 специфичность Набора реагентов «HE4-ИФА» составляет 100% по сывороткам данной панели.

3.2. Чувствительность на сыворотках панели производителя.

При проверке на стандартной панели предприятия (СПП № 239 «Сыворотки крови человека, содержащие и не содержащие антиген HE4», утвержденной генеральным директором ООО «ХЕМА» 10.01.2012 г.), состоящей из 30 нативных образцов сыворотки и плазмы крови человека, достоверно содержащих и не содержащих антиген HE4 чувствительность Набора реагентов «HE4-ИФА» составляет 100% по сывороткам данной панели.

3.3. Аналитическая специфичность. Использование подобранной на испытательной базе ООО «ХЕМА» пары мышинных моноклональных антител к антигену HE4 человека позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.4. Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «HE4-ИФА» концентрация антигена HE4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,5 Ед/мл.

3.5. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания антигена HE4 в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «HE4-ИФА» не превышает 8,0%.

3.6. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» антигена HE4 - соответствие измеренной концентрации антигена HE4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 Ед/мл.

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.7. Линейность. Зависимость концентрации антигена HE4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей антигена HE4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 25-400 Ед/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.8. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Нижний предел, Ед/мл	Верхний предел, Ед/мл
Здоровые доноры (мужчины и женщины)	0,0	35
Беременные:		
I триместр	0,0	60
II триместр	0,0	150
III триместр	0,0	200
Период лактации	0,0	80

В соответствии с требованиями GLP (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «НЕ4-ИФА» уточнить значения концентрации антигена НЕ4, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

3.9. Интерференция. Изучение образцов плазмы с различными антикоагулянтами показало, что такие антикоагулянты как ЭДТА, гепарин и цитрат натрия не приводят к матричному эффекту.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора по ГОСТ 31508–2012 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» и Номенклатурной классификации медицинских изделий, утв. Приказом Минздрава Российской Федерации от № 4н от 6 июня 2012 года (в ред. Приказа Минздрава России от 25.09.2014 N 557н) – класс 2б.

4.2. Все компоненты Набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

4.5. Меры предосторожности-соблюдение *«Правил 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).

4.6. Медицинские отходы класса Б. 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».

Медицинское изделие при необходимости утилизируется в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.2790 по классу Б эпидемиологически опасные отходы.

4.7. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

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

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;
- **термостат**, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C;
- **цилиндр мерный** вместимостью 500 мл;
- **вода дистиллированная**;
- **перчатки** резиновые или пластиковые;
- **бумага** фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25$ °C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре $+2-8$ °C не более 24 ч или при температуре минус 20 °C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «HE4-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации антигена HE4 в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в

упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрата + 19 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация антигена НЕ4 в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови превышает 400 Ед/мл, его следует предварительно развести, используя калибровочную пробу 0 Ед/мл.

7.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.3. Внести во все лунки планшета по 50 мкл конъюгата.

Внесение конъюгата в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.4. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 15-25 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.7. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом

7

содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести не позднее 5 мин после внесения стоп-реагента.

В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре, планшет допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 4 ч.

8.2. Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках с калибровочной пробой 0 Ед/мл из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину **В** - среднее арифметическое значение величины ОП в лунках, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку или исследуемые образцы. Если же фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок с калибровочной пробой 0 Ед/мл, то необходимо пользоваться формулой **В-В₀**, где В₀ - среднее арифметическое значение величины ОП в лунках с калибровочной пробой 0 Ед/мл.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация антигена НЕ4 в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀).

9.2. Определить по калибровочному графику содержание антигена НЕ4 в исследуемых образцах.

9.3. Если исследуемый образец сыворотки (плазмы) дополнительно разводили (см. п. 7.1.), умножить полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «НЕ4-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;

- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

- конъюгат и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес.;
- стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20°C в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «НЕ4-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА»
М.П.



к. б. н. Д. С. Кострикин

«СОГЛАСОВАНО»

Научный руководитель

испытательной лаборатории

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

д.м.н., профессор _____ Долгов В.В.

«___» _____ 2015 г.

М.П.



02 ФЕВ 2016

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 2 ЛИСТОВ
« 02 » ФЕВ 2016 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Г.К. Варнавичус

