

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«30» августа 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммунохемилюминесцентного определения концентрации ракового эмбрионального антигена в сыворотке крови (РЭА-ЛЮМО-БЕСТ) (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации ракового эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА).

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая калибровочные и контрольный образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения РЭА основан на одностадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммунохемилюминесцентного анализа с использованием моноклональных антител к РЭА с различной эпитопной специфичностью. В лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносятся калибровочные и контрольный образцы с известными концентрациями РЭА, исследуемые образцы сыворотки крови и пероксидазный конъюгат антител к РЭА. Образовавшиеся во время инкубации иммунные комплексы «моноклональные антитела – РЭА – конъюгат» после отмывки избытка конъюгата инкубируют с раствором люминола. При этом происходит эмиссия фотонов в лунках. Интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации РЭА в анализируемых образцах. Результаты ИХЛА регистрируются измерением интенсивности люминесценции в лунках планшета.

Концентрацию РЭА в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией гормонов и опухолевых маркеров Н.Н. Сорокиной и с.н.с.

зависимости интенсивности люминесценции от содержания РЭА в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к РЭА	1 шт.
Калибровочные образцы* <i>Содержат известные количества РЭА – 0; 5; 25; 100; 250; 500 нг/мл. Содержат ProClin 300 (0,03%).</i>	6 фл. по 0,4 мл
Контрольный образец <i>Содержит количество РЭА в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, нг/мл. Содержит ProClin 300 (0,03%).</i>	1 фл., 0,4 мл
Конъюгат <i>Конъюгат моноклональных антител к РЭА с пероксидазой хрена. Содержит ProClin 300 (0,028%), ProClin 150 (0,004%), фенол (0,015%).</i>	1 фл., 23,0 мл
Раствор для разведения сывороток (PPC) <i>Содержит ProClin 300 (0,0005%)</i>	1 фл., 12,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твинном (ФСБ-Т×25) <i>Содержит ProClin 300 (0,25%).</i>	1 фл., 28,0 мл
Хемилюминесцентный субстрат А (ЛЮМ-А) <i>Содержит натрия азид (0,05%).</i>	1 фл., 7,0 мл
Хемилюминесцентный субстрат Б (ЛЮМ-Б)	1 фл., 0,7 мл
Пленка для заклеивания планшета	1 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

*аттестованы относительно WHO Reference Reagent Carcinoembryonic Antigen (CEA), Human, 1th International Reference Preparation NIBSC 73/601.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Воспроизводимость – коэффициент вариации не превышает 8%.

3.2.* Линейность в диапазоне концентраций РЭА 5-500 нг/мл – в пределах 90% – 110%.

3.3.* Тест на «открытие» – в пределах 90% – 110%.

3.4.* Аналитическая чувствительность – минимально определяемая концентрация РЭА не превышает 0,1 нг/мл.

3.5. «Хук»-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации РЭА 4098 нг/мл.

3.6. Концентрация РЭА, измеренная в сыворотке крови, взятой у 168 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–50 лет, не превышала 5 нг/мл.

3.7. 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. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Некоторые компоненты содержат ProClin 150, ProClin 300, фенол, натрия азид в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными 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 клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. 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».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Люминометр микропланшетный, позволяющий проводить измерения интенсивности люминесценции растворов в лунках планшета в диапазоне длин волн 390-460 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 5000 мкл;
- дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 10 до 300 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;

- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная;
- дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки крови человека.

6.3. Образцы сыворотки крови следует хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток, или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. **Внимание!** *Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИХЛА.*

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 мин.

– При детальном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ФСБ-Т×25 при температуре (2–30) °С.

– Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на хемилюминесцентный субстрат А (ЛЮМ-А) и рабочий раствор хемилюминесцентного субстрата (см. п. 7.5.) при подготовке и проведении ИХЛА.

– При постановке ИХЛА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-

Т×25, ЛЮМ-А, ЛЮМ-Б), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– Для приготовления растворов и проведения ИХЛА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИХЛА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для рабочего раствора хемилюминесцентного субстрата ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при (18-26) °С не более 7 суток.

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Приготовление рабочего раствора хемилюминесцентного субстрата.

Внимание! Готовить за 30 минут перед непосредственным использованием.

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Рабочий раствор хемилюминесцентного субстрата	
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		ЛЮМ-А, мл	ЛЮМ-Б, мл
2	4,0	до 100	3,6	1,0	0,10
3	6,0	до 150	5,5	1,5	0,15
4	8,0	до 200	7,0	2,0	0,20
5	10,0	до 250	9,0	2,5	0,25
6	12,0	до 300	11,0	3,0	0,30
7	14,0	до 350	12,0	3,5	0,35
8	16,0	до 400	14,0	4,0	0,40
9	18,0	до 450	16,0	4,5	0,45
10	20,0	до 500	18,0	5,0	0,50
11	22,0	до 550	20,0	5,5	0,55
12	24,0	до 600	22,0	6,0	0,60

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в ванночку для реагентов или в стеклянный флакон необходимое количество ЛЮМ-А и добавить соответствующее количества ЛЮМ-Б, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (18-26) °С не более 6 ч в защищенном от света месте.

7.6. Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

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.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

8.2. Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (см п. 7.4), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 30 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре (37±1) °С.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время

между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 50 мкл рабочего раствора хемилюминесцентного субстрата (см п. 7.5). Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-20 сек, затем поместить планшет в люминометр и инкубировать 5 мин.

Остатки рабочего раствора хемилюминесцентного субстрата из ванночки утилизировать.

8.5. Измерить интенсивность люминесценции растворов в лунках стрипов с помощью люминометра в диапазоне длин волн 390-460 нм. Измерение проводить не позднее чем через 6 мин после внесения рабочего раствора хемилюминесцентного субстрата.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения интенсивности люминесценции от концентрации РЭА в калибровочных образцах (нг/мл).

9.3. Определить концентрацию РЭА в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

Если концентрация РЭА в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 500 нг/мл, образец следует дополнительно развести РРС в 20 раз (10 мкл исследуемого образца + 190 мкл РРС), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

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

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 (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

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

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

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

10.5. Для предоставления результатов измерений концентрации РЭА в мМЕ/мл, следует использовать коэффициент пересчета 11 (1 нг/мл РЭА = 11 мМЕ/мл РЭА).

10.6. Набор предназначен для однократного применения.

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-ЛЮМО-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 227-75-41.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

С. н. с. лаборатории гормонов
и опухолевых маркёров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

А.С. Сальников

Зав. лаборатории гормонов
и опухолевых маркёров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
М.П.



Т.И. Пospelова



Пропиновано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НИИОХ
Минздрава России Захарова Л.Н.
“ 30 08 ” 2019 г.

