

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-НЕ4 предназначен для количественного определения концентрации НЕ4 в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2 Онкомаркер НЕ4 является протеином с молекулярной массой приблизительно 25 кДа, относящийся к семейству белков, содержащих 4 дисульфидных связи в коровой части. НЕ4 обладает свойствами, способствующими опухолевой прогрессии, например, усиливает миграцию и адгезию клеток рака яичника. Усиленный синтез НЕ4 характерен для некоторых злокачественных опухолей, что позволяет использовать этот белок в качестве онкомаркера. Наибольшее значение НЕ4 имеет в диагностике, оценке прогноза и контроле лечения опухолей яичника и эндометрия.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- иммуносорбент - 96-луночный стриповый полистирольный планшет, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок с иммобилизованными моноклональными антителами к НЕ4, готов к использованию, 1 планшет;

- конъюгат моноклональных антител к НЕ4 с пероксидазой хрена, готов к использованию, 1 флакон, $(14 \pm 1,0)$ мл, прозрачная жидкость розового цвета;

- шесть калибровочных проб на основе буферной системы, в диапазоне концентраций НЕ4 (0; 25-1000) пмоль/л (точные значения концентраций НЕ4 указываются на этикетках флаконов) – готовы к использованию, 6 флаконов (калибровочные пробы C_0-C_5) по $(0,6 \pm 0,1)$ мл, прозрачные жидкости фиолетового цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость). Значения концентраций НЕ4 в калибровочных пробах определены с использованием внутреннего стандарта;

- контрольная сыворотка (КС) на основе сыворотки крови человека, содержащая известное количество НЕ4 (диапазон концентрации НЕ4 указывается на этикетке), готова к использованию, 1 флакон по $(0,6 \pm 0,1)$ мл, прозрачная жидкость желтого или светло-желтого цвета;

- концентрат промывочного раствора (КПР) (солевой раствор с твин-20), 1 флакон, $(22 \pm 1,0)$ мл, прозрачная бесцветная жидкость;

- ТМБ-субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в растворе, содержащем перекись водорода), готов к использованию, 1 флакон, $(14 \pm 1,0)$ мл, прозрачная бесцветная жидкость;

- стоп-реагент (раствор серной кислоты), готов к использованию, 1 флакон, $(14 \pm 1,0)$ мл, прозрачная бесцветная жидкость;

- пленка для заклеивания планшета, 2 шт.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 41 неизвестной пробы, 6 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 96 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций НЕ4 (2,5-1000) пмоль/л.

2.5 Иммуноферментное определение HE4 относится к анализам типа «сэндвич», в котором используется два вида моноклональных антител к различным эпитопам его молекулы.

Калибровочные пробы, контрольная сыворотка и исследуемые образцы инкубируют в лунках полистирольного планшета с иммобилизованным первым моноклональным антителом в присутствии второго моноклонального антитела, меченного пероксидазой хрена.

HE4, присутствующий в сыворотке крови человека, связывается с иммобилизованными на стенках лунок моноклональными антителами к HE4. С HE4 связываются и меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела к HE4.

После инкубации содержимое лунок удаляют. Меченые антитела, не связавшиеся с иммобилизованным комплексом антитело-HE4, удаляют с помощью промывки лунок планшета. После отмывания несвязанных компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя (ТМБ-субстрат). Пероксидазную реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450 нм, которая пропорциональна концентрации HE4 в исследуемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Присутствие в наборе ИФА-HE4 некоторых биологических компонентов, химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

3.2 Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для применения *in vitro*.

3.3 Сыворотка крови человека, использованная для приготовления контрольной сыворотки, инактивирована нагреванием, проверена и считается не содержащей HBsAg, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1/2 и гепатита С. С исследуемыми образцами и контролями необходимо обращаться как с потенциально инфекционным материалом, поскольку ни один из известных методов тестирования не может гарантировать 100 % выявления инфекционных агентов.

3.4 При работе с набором необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, одноразовые резиновые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток, т.к. данный набор содержит производные крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

3.5 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], [3], [4]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [5].

3.6 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.7 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. Если пролита кислота, сначала нейтрализовать ее бикарбонатом натрия и вытереть фильтровальной бумагой.

3.8 Инструменты, оборудование, рабочие поверхности столов необходимо обрабатывать 70 % этиловым спиртом до и после работы.

3.9 Жидкие потенциально инфицированные отходы обеззараживают дезинфицирующими средствами, разрешенными Министерством здравоохранения Республики Беларусь для обеззараживания жидких отходов, согласно инструкции по их применению.

3.10 Все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и автоклавировать в течение 1 ч при температуре $(126 \pm 2)^\circ\text{C}$ и давлении $(0,15 \pm 0,02)$ МПа.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток хранят при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20°C) не более одного раза. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

4.2 Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, не пригодны для анализа.

4.3 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- температура в помещении, где проводится анализ, должна быть $(18-25)^\circ\text{C}$;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- не допускается использование реагентов с нарушением герметичности упаковки;
- использовать только новые наконечники для внесения каждого образца и реагента;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;

- не допускается проведение анализа в присутствии паров перекиси водорода, кислот, щелочей, альдегидов, хлорсодержащих соединений, а также пыли, которые могут снижать ферментативную активность конъюгата;
- ферментная реакция очень чувствительна к ионам металлов, поэтому не допускается контакт реагентов с металлами;
- ТМБ-субстрат перед использованием должен быть бесцветным, при его окрашивании необходимо заменить на новый;
- не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и ТМБ-субстрата.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- спектрофотометр вертикального сканирования;
- суховоздушный термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов, 8-ми или 12-ти канальное;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 до 5,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,30 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%) или аналогичные им;
- вихревой смеситель;
- магнитная мешалка;
- цилиндры мерные вместимостью 10; 25; 100; 500; 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- стаканы химические мерные вместимостью 25; 500; 1000 мл;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- пробирка одноразовая с пробкой вместимостью 4 мл;
- штатив для пробирок;
- флакон пластмассовый вместимостью 20 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- спирт этиловый 70 %;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

6.1 Образцы сывороток крови, в том числе полученных с помощью активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него), могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8) °С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С и ниже в течение двух месяцев. Не использовать сыворотки, которые замораживались/размораживались более одного раза.

6.2 Размораживание образцов сывороток проводить при температуре (18-25) °С. Образцы тщательно перемешивать пипетированием в течение не менее 1 мин для достижения однородности.

6.3 Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1 Перед использованием выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сывороток крови при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

7.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать колпачками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в защищенном от света месте в плотно закрытой первичной упаковке следующим образом:

- оставшиеся стрипы необходимо тщательно заклеить пленкой для заклеивания планшета и хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;
- конъюгат, ТМБ-субстрат, стоп-реагент, концентрат промывочного раствора после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;
- калибровочные пробы и контрольные сыворотки после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

ВНИМАНИЕ! Не используйте компоненты из аналогичных наборов других серий.

7.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 26 раз)

Внести в стакан химический мерный вместимостью 1000 мл с помощью цилиндра мерного 550 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с КПР и тщательно перемешать на магнитной мешалке. В случае дробного использования набора следует отобрать необходимое количество концентрата промывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл промывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

Приготовленный промывочный раствор может храниться при температуре (2-8) °С не более 45 суток или при температуре (18-25) °С не более 15 суток.

Таблица 1 – Расход реагентов набора

Количество стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат,	ТМБ-субстрат,	Стоп-реагент,
	КПР,	Дист. вода,			
	мл	мл	мл	мл	мл
1	1,6	40	1	1	1
2	2	50	2	2	2
3	2,8	70	3	3	3
4	3,2	80	4	4	4
5	3,6	90	5	5	5
6	4,4	110	6	6	6
7	4,8	120	7	7	7
8	5,6	140	8	8	8
9	6	150	9	9	9
10	6,4	160	10	10	10
11	7,2	180	11	11	11
12	8	200	12	12	12

8 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

8.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер, в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-ми канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них, лунки должны заполняться промывочным раствором (по 250 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- промывочный раствор должен находиться в лунках не менее 40 с;

- после последней аспирации в лунках не должно быть остатков жидкости. При необходимости удалить остатки влаги, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге;

Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9. Перед началом работы вскрыть пакет с иммуносорбентом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Составить протокол маркировки лунок, из расчета, что калибровочные пробы (маркировка лунок В₀-В₅), контрольная сыворотка (маркировка лунок КС), все образцы исследуемых сывороток крови человека (маркировка лунок В_х), ставятся в дубликатах.

9.2 В лунки планшета внести по 0,02 мл (20 мкл):

- калибровочных проб С₀-С₅ – каждая калибровочная проба в отдельные, предназначенные для нее лунки;
- контрольной сыворотки КС – в предназначенные для нее лунки;
- образцов исследуемых сывороток крови человека.

ВНИМАНИЕ! Общее время внесения калибровочных проб, контрольных сывороток и образцов исследуемых сывороток не должно превышать 15 мин, иначе время инкубации разных образцов будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

9.3 Во все лунки внести по 0,1 мл (100 мкл) конъюгата. Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.

9.4 Планшет заклеить пленкой и инкубировать при температуре +37 °С в течение 60 мин.

9.5 Удалить содержимое из всех лунок с помощью вошера или 8-ми канальной пипетки, промыть все лунки планшета 5 раз по 0,25 мл (250 мкл) промывочным раствором, приготовленным по п.п. 7.3, и после последней аспирации удалить остатки влаги, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.6 Во все лунки внести по 0,1 мл (100 мкл) ТМБ-субстрата. Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.

9.7 Планшет инкубировать при температуре (18-25) °С в темном месте в течение (10-20) мин (в зависимости от степени развития окраски).

9.8 Остановить цветную реакцию путем внесения во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности, что и ТМБ-субстрат). Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.

9.9 Сразу после остановки цветной реакции определить оптическую плотность (ОП) в лунках при длине волны 450 нм.

В случае невозможности (по техническим причинам) своевременно измерить ОП в лунках, планшет допускается хранить при температуре (2-8) °С не более 15 мин.

9.10 Последовательность операций анализа приведена в таблице 2.

Таблица 2

Лунки (в дуб- лика- тах)	Последовательность операций			
	Калибр. пробы, КС и подготовленные исследуемые сыворотки крови человека, мкл	Конъюгат мкл	Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.	Планшет заклеить пленкой и инкубировать при +37 °С в течение 60 мин
В ₀ -В ₅	20	100		
КС	20	100		
В _х	20	100		

Продолжение таблицы 2

Лунки (в дуб- лика- тах)	Последовательность операций						
	С помощью вошера или 8-ми канальной пипетки	Промы- вочный раствор мкл	Удалить промывочный раствор. Повторить 4 раза стадию промывки.	ТМБ- субстрат мкл	Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.	Планшет инкубировать при (18-25) °С в темном месте в течение (10-20) мин без встряхивания.	Стоп- реагент, мкл
V ₀ -V ₅	удалить содержимое	250		100			100
КС		250		100			100
V _x		250		100			100
Сразу после остановки цветной реакции измерить ОП при длине волны 450 нм							

10 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА ОТКРЫТОГО ТИПА

10.1 Включить анализатор и задать программу проведения ИФА-НЕ4.

10.2 Приготовленный промывочный раствор залить в предназначенную для него емкость, входящую в комплект к анализатору.

10.3 В специальные штативы анализатора поместить готовые к использованию компоненты набора (конъюгат, калибровочные пробы, КС, ТМБ-субстрат, стоп-реагент),

10.4 Емкости с исследуемыми образцами сыворотки крови установить в соответствующие штативы анализатора.

10.5 Поместить в анализатор иммуносорбент (планшет).

10.6 Провести постановку ИФА в соответствии с инструкцией по эксплуатации автоматического анализатора и программой проведения ИФА-НЕ4.

10.7 Данная процедура анализа адаптирована для набора ИФА-НЕ4 с использованием автоматических анализаторов типа Freedom EVOlyzer (Tecan).

11 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

11.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП, в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы (V₀-V₅), контрольной сыворотки (V_{КС}), исследуемые образцы сыворотки крови (V_x).

11.2 Построить калибровочный график в линейных или полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в ОЕ, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентрации НЕ4, в пмоль/л, в соответствующих калибровочных пробах.

11.3 Определить по калибровочному графику содержание НЕ4, в пмоль/л, в КС. Содержание НЕ4 в КС должно соответствовать указанному на этикетке.

11.4 По калибровочному графику определить содержание НЕ4, в пмоль/л, в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

12 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

12.1 Чувствительность

Минимальная концентрация HE4, определяемая с помощью набора, составляет не более 2,5 пмоль/л.

12.2 Специфичность

Моноклональные антитела, используемые в наборе, обладают высокой специфичностью к HE4.

12.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений ($n=10$) концентрации HE4 в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием HE4 не превышает 8 %.

12.4 Тест на «открытие»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций HE4 в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки КС и калибровочной пробы C_2 составляет (80-120) %.

12.5 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИФА-HE4 концентрация HE4 в сыворотке крови здоровых лиц находится в диапазоне 0-150 пмоль/л, составляя в среднем ~ 29 пмоль/л.

13 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

13.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °C в течение всего срока годности набора. Допускается хранение набора при температуре до 25 °C не более 5 суток.

Замораживать компоненты набора запрещается.

13.2 Срок годности набора – 12 месяцев.

13.3 Определение концентрации HE4 с помощью набора ИФА-HE4 проводят в сыворотке крови человека.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре (2-8) °C в течение 3 суток до проведения анализа. Более длительное хранение образцов сыворотки крови (до 2 месяцев) возможно при температуре минус 20 °C и ниже. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов. Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

13.4 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

13.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	Серийный номер Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	Использовать до Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
	Изделие для диагностики in vitro
	Содержимого достаточно для проведения n-тестирований Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	Ограничение температуры Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	Обратитесь к руководству по эксплуатации Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия
	Изготовитель Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя



УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3,
220141, г. Минск, Республика Беларусь

Тел./факс +375-17-360-93-60 E-mail: hopmang.bel@gmail.com <http://www.hopiboh.org>

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК,
тел. +375-17-396-87-38

Библиография

- [1] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
- [2] СП 17-69 РБ-98
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г. № 18 (ред. от 03.04.17)

- [3] Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2017 г. № 2
- [4] Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 г. № 11
- [5] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»

Инструкция составлена:

сотрудниками УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»:

начальник научно-технического отдела, к.б.н.  А.И. Щербань

научный сотрудник  Ю.А. Мытько

сотрудником ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»:

зав. онкологической лабораторией
вирусологии, к.б.н.



Е.В. Гапеев

