«УТВЕРЖДЕНА»
Приказом Росздравнадзора
от «26» марта 2012 г. № 1362-Пр/12

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(«ОнкоИФА-РЭА»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-РЭА» предназначен для количественного определения раково-эмбрионального антигена (РЭА) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. РЭА – гликопротеин с молекулярной массой 180 кДа, первый из группы так называемых онкофетальных белков. РЭА – наиболее часто используемый маркер при обнаружении рака желудочно-кишечного тракта.

Обнаружение РЭА связано, прежде всего, с раком толстой и прямой кишки, однако, другие злокачественные новообразования (опухоли молочной железы, легких, поджелудочной железы, яичников и других органов) также могут приводить к повышению его концентрации. Существует ряд доброкачественных состояний, при которых концентрация РЭА значительно превышает норму, в частности, воспалительные процессы в легких и желудочно-кишечном тракте и доброкачественные новообразования печени.

С клинической точки зрения значение концентрации РЭА само по себе не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами. Имеются случаи, когда у пациентов с колоректальным раком не было обнаружено повышения концентрации РЭА. Кроме того, повышенные концентрации РЭА не всегда изменяются в соответствии с картиной прогрессии или регрессии заболевания. У курильщиков интервал нормальных концентраций РЭА принимает более широкие значения, чем у некурящих.

1.3. Набор «ОнкоИФА-РЭА» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ОнкоИФА-РЭА» использован одностадийный «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа (Рисунок 1). В лунки, покрытые стрептавидином, вносятся калибровочные пробы с известным содержанием РЭА, контрольная сыворотка и анализируемые образцы. Затем добавляется раствор, представляющий собой смесь конъюгатов двух моноклональных антител к РЭА с различной эпитопной специфичностью. Первое антитело конъюгировано с биотином (на Рисунке 1: МАТ1-биотин), второе антитело – с пероксидазой (на Рисунке 1: МАТ2-пероксидаза). В результате реакции между моноклональными антителами и молекулой РЭА образуется комплекс, который связывается со стрептавидином, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. После окончания инкубации антитела, которые не связались с молекулами РЭА, удаляются промывкой.

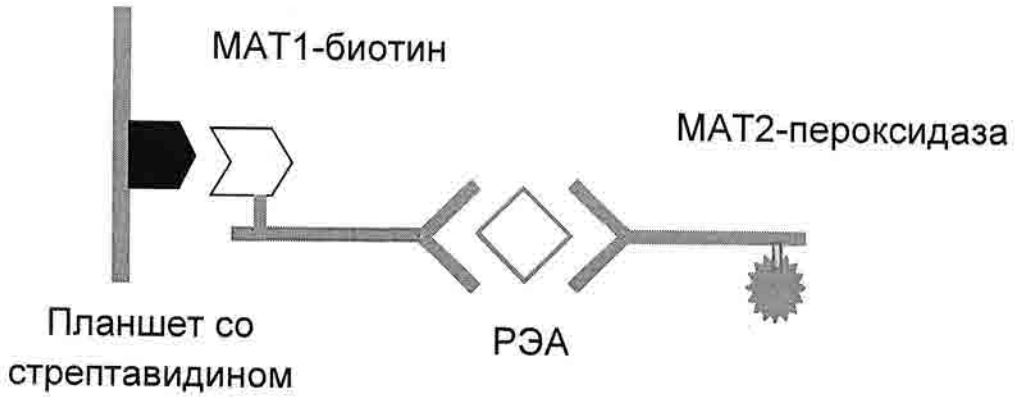


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации РЭА в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация РЭА в исследуемых образцах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2. Состав набора

• комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином» - 1 упаковка;

• калибровочные пробы (КП), аттестованные по Первому международному стандарту (The 1st International Reference Preparation (IRP №73/601)), содержащие известные количества РЭА. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций РЭА в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные - 0; 5; 10; 25; 100; 250 нг/мл – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 1,0 мл);

• раствор, содержащий конъюгат моноклональных мышиных антител к РЭА с биотином и конъюгат моноклональных мышиных антител к РЭА с пероксидазой, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (13 мл);

• концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер М» – 1 флакон (20 мл);

• раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);

• стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);

• контрольная сыворотка с известным содержанием РЭА, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Данные по интерференции ряда лекарственных препаратов и белковых аналитов приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Вещество	Концентрация, при которой не наблюдается влияния на результат анализа
Ацетилсалициловая кислота	100 мкг/мл
Аскорбиновая кислота	100 мкг/мл
Кофеин	100 мкг/мл
АФП	10 мкг/мл
ПСА	1,0 мкг/мл
СА-125	10 000 Ед/мл
ХГч	1000 МЕ/мл
ЛГ	10 МЕ/мл
ТТГ	100 мМЕ/мл
Пролактин	100 мкг/мл

3.2. Коэффициент вариации результатов определения РЭА в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ОнкоИФА-РЭА» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации РЭА в исследуемых образцах при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» РЭА — проверка соответствия значения определяемой концентрации РЭА расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация РЭА в сыворотке крови человека не превышает 1 нг/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ОнкоИФА-РЭА» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации РЭА 60 000 нг/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. У большинства здоровых некурящих людей концентрация РЭА составляет < 5 нг/мл, у здоровых курящих людей <10 нг/мл.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм, 405нм и 620 нм (референтная длина волны). Применение длины волны 620 нм не является обязательным, но позволяет обнаружить интерференцию пластика;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2…8°С не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой внести по 1 мл дистиллированной воды, во флакон с контрольной сывороткой – 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,08 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз.

Например:

5 мл буфера М + 245 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор ТМБ готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

реагента на один стрип составляет 0,75 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18…25°С).

7.1.8. Разведение исследуемых образцов сыворотки крови. Если концентрация РЭА в исследуемом образце по предварительным данным или по результатам анализа (см. **п.9.3**) выше КП №6, образец следует развести сывороткой крови здорового человека (с концентрацией РЭА < 5 нг/мл) в 10 или более раз и проанализировать повторно. При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

На странице 19 приведена схема проведения анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки - по 25 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: *общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.3. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата.

Примечание: *Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну покрытой стрептавидином лунки.*

7.2.4. Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20-30 секунд.

7.2.5. Инкубировать стрипы в темноте в течение 60 минут при комнатной температуре (+18…25°C) без шейкирования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.**7.1.4,** встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 10-30 минут в зависимости от степени развития окраски.

7.2.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 15-20 секунд.

7.2.9. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.8**., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

Примечание: *максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

В случае если оптическая плотность калибровочной пробы №6 превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.

***Примечание**: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП при 450 нм.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации РЭА (нг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: *при применении референтной длины волны 620 нм оптические плотности каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки и исследуемых образцов, полученные при 620 нм, вычитают из оптических плотностей, полученных при основной длине волны, эти значения используют для построения калибровочного графика.*

Примечание 2: *для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

Примечание 3: *для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.*

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B–B_T,$$

где B *– среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;*

B_T *– среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.*

9.2. Определить содержание РЭА в пробах по калибровочному графику. В случае разведения образцов необходимо измеренную концентрацию РЭА умножить на фактор разведения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации РЭА, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации РЭА в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с **п. 7.1.8**.

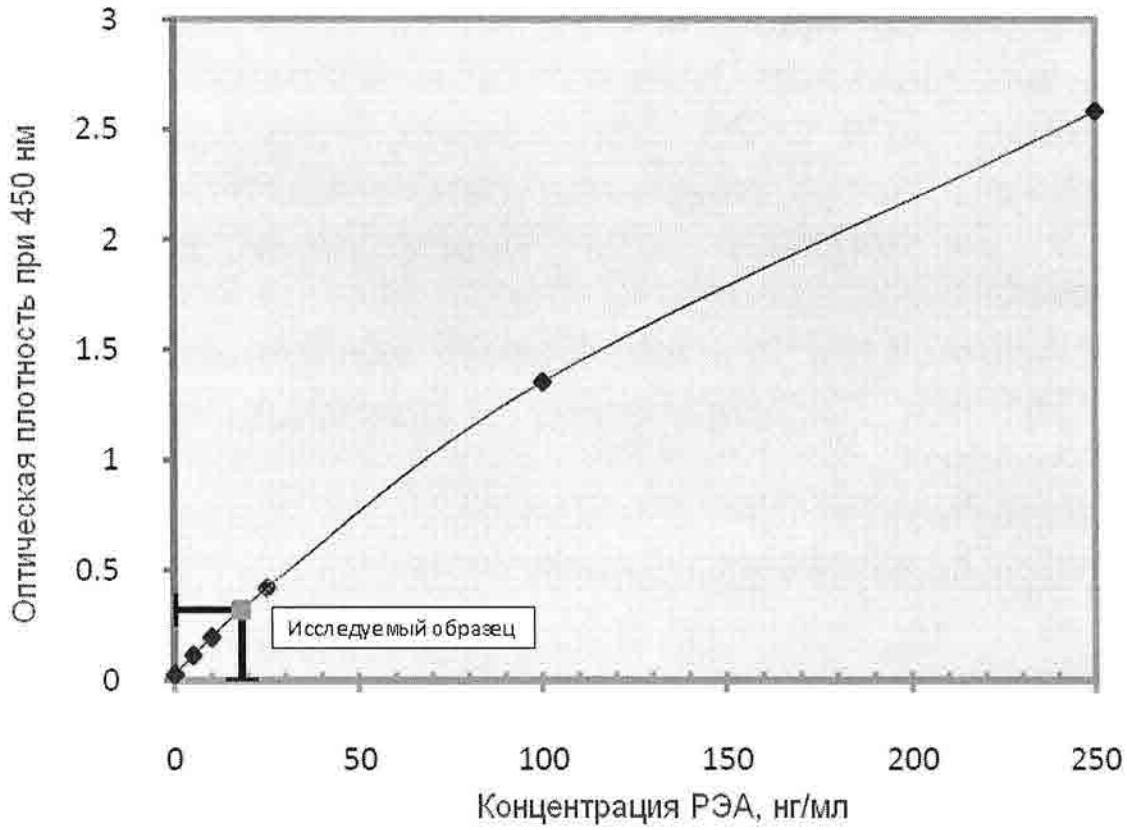


Рисунок 2. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-РЭА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2…8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

– стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре +2…8°С;

– калибровочные пробы, контрольную сыворотку, буфер М, стоп-реагент, раствор ТМБ и конъюгат после вскрытия флаконов хранить при температуре +2…8°С;

– промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25°С).

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации РЭА в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать их в рекомендуемые условия хранения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ и стоп-реагента, входящих в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	**25 мкл** *КП и КС*	**КТ**	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		**25 мкл** *исследуемых образцов*			
3		**100 мкл** *коньюгата*			
4	**Инкубация**	—	**КТ**	60'	Перед инкубацией перемешать 20-30 секунд. В темноте без шейкирования
5	Промывка	**300 мкл** в лунку *1*промывочного раствора* (5 раз)			**1***промывочный раствор= =20 мл буфера М+980 мл H_2O
6	Внесение хромогена	**100 мкл** *ТМБ*			
7	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	10 - 30'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	**50 мкл** *стоп-реагента*			
9	Перемешивание		**КТ**	15-20 секунд	
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	**Фотометр,** 450,405 нм (см.п. 8.), (620 нм)
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания к схеме: *КП — калибровочная проба;*
КС — контрольная сыворотка;
ОП — оптическая плотность;
КТ — комнатная температура (+18...25°С);
ПО – программное обеспечение.

По вопросам качества набора «ОнкоИФА-РЭА» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru