

«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

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.

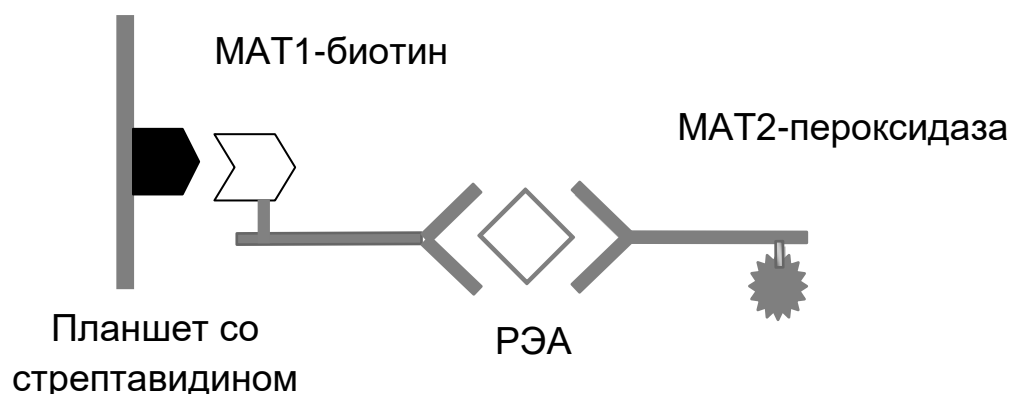
**1.3.** Набор «ОнкоИФА-РЭА» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

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

## 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.

## 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 1<sup>st</sup> 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 (лиофилизированные препараты или жидкости по 1,0 мл);

- раствор, содержащий конъюгат моноклональных мышинных антител к РЭА с биотином и конъюгат моноклональных мышинных 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 (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

### 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%.

**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.

## **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.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм, 405 нм 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.



## **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  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

### **7.1. Подготовка реагентов**

**7.1.1. Стрипы.** Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) 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 лиофилизированных 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-

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°C).

**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.

## 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.

**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.

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.*

## 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:

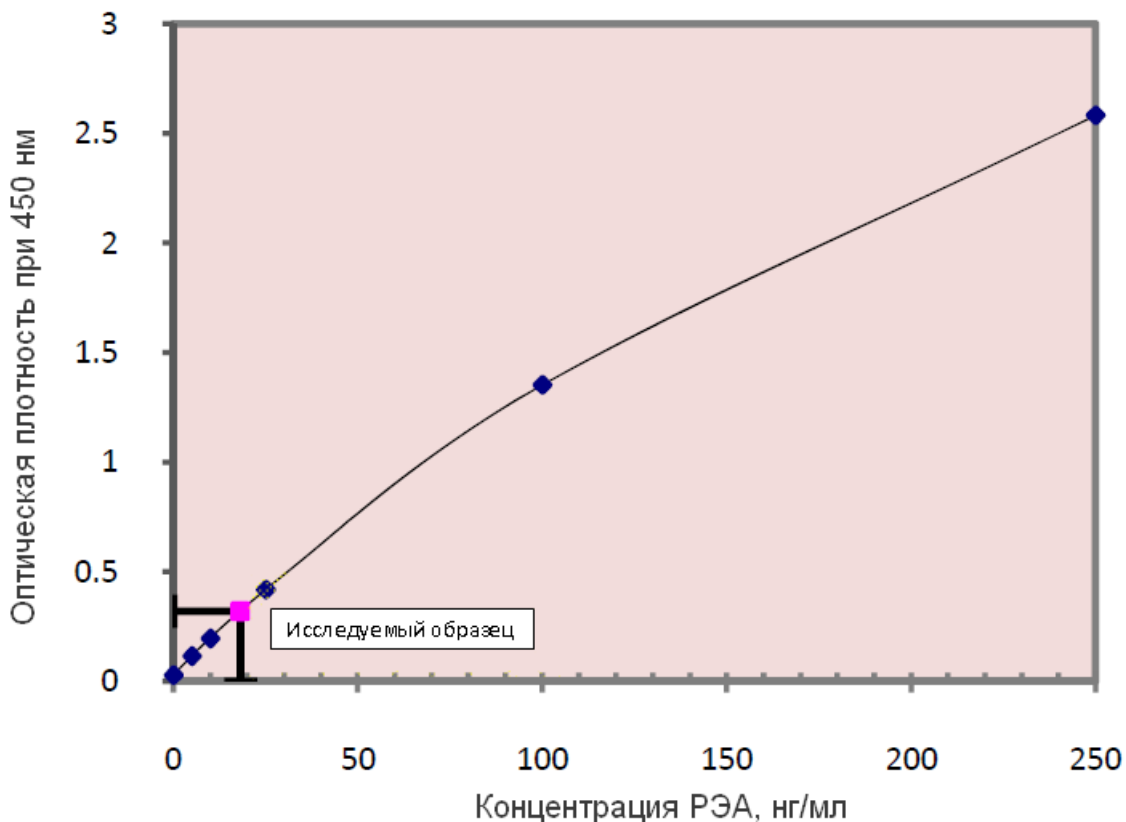
$$B - B_T,$$

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.

**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!*



## **10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**10.1.** Набор «ОнкоИФА-РЭА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  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  $+2...8^{\circ}\text{C}$ ;

– калибровочные пробы, контрольную сыворотку, буфер М, стоп-реагент, раствор ТМБ и конъюгат после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$ ;

– промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ).

**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.

**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.

## 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 конъюгата			
4	<b>Инкубация</b>	—	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 <sub>2</sub> O
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	<b>Инкубация с ТМБ</b>	—	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 останова ферментной реакции	<b>Фотометр,</b> 450,405 нм (см.п. 8.), (620 нм)
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО