

ВЕКТОР



Набор реагентов  
для иммуноферментного определения  
концентрации нейронспецифической  
енолазы (NSE) в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

---

**NSE – ИФА – БЕСТ**

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**T-8476**



## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1.** Набор реагентов «NSE – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации нейронспецифической енолазы (NSE) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** NSE (2-фосфо-D-глицерат-гидролиаза) – внутриклеточный гликолитический фермент с молекулярной массой 78 кДа. NSE существует в виде нескольких димерных изоферментов ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$ ,  $\gamma\gamma$ ), образованных из трех типов субъединиц  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Диагностически значимыми являются гомологические  $\gamma\gamma$ - или гетерологические  $\alpha\gamma$ -изоферменты, которые называют нейронспецифической енолазой (NSE).

NSE выявляется в нейронах, нейроэктодермальных и нейроэндокринных клетках, а также в форменных элементах крови (эритроцитах, тромбоцитах, плазматических клетках).

**1.3.** Количественное определение NSE в сыворотке крови может быть использовано для диагностики мелкоклеточного рака легких и нейробластомы, динамического контроля уровня фермента с целью оценки эффективности проводимой терапии, раннего выявления рецидивов и недиагностируемых метастазов, а также прогнозирования течения заболевания.

Концентрация NSE в сыворотке крови большинства здоровых людей не превышает 13 нг/мл.

Повышенный уровень NSE определяется у больных мелкоклеточной карциномой легких и нейробластомой. Концентрация NSE в сыворотке крови может повышаться при опухолях нейроэктодермального или нейроэндокринного происхождения (феохромцитоме, медуллярной карциноме щитовидной железы, меланоме, карциноме из островковых клеток поджелудочной железы и др.) и при некоторых опухолях не-нейроэндокринного происхождения (карциноме молочной железы, аденокарциноме поджелудочной железы, множественной миеломе, семиноме, некоторых видах лимфом и др.). Повышенное содержание фермента в сыворотке крови наблюдается также при лейкозах, после лучевой или рентгенотерапии, рентгеновского обследования. Концентрация NSE может возрасти у пациентов с уреимией после процедуры диализа.

Повышение концентрации NSE до 20 нг/мл может встречаться при доброкачественных заболеваниях легких, поэтому для клинической диагностики мелкоклеточной карциномы легких определен более высокий уровень границы – более 25 нг/мл.

В ряде исследований показано, что у большинства онкобольных уровень NSE повышается еще до появления клинических симптомов рецидива. Стойкое повышение концентрации NSE в крови связано, как правило, с неэффективностью проводимой терапии. Уровень NSE

в сыворотке крови после успешно проведенного лечения постепенно снижается до нормальных значений.

Количественные определения NSE в спинномозговой жидкости и сыворотке крови позволяют оценить степень повреждения нейронов и нарушения общей целостности гематоэнцефалического барьера при ишемических и геморрагических инсультах, эпилепсии, паркинсонизме и других деструктивных заболеваниях центральной нервной системы.

**1.4.** Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и одного контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

## **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

### **2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА**

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к молекуле NSE.

Используемые моноклональные антитела связываются с  $\gamma$ -субъединицей фермента и, следовательно, детектируют  $\gamma\gamma$  и  $\alpha\gamma$  формы. В лунках при инкубации исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител с пероксидазой хрена происходит связывание молекулы NSE с моно-

клональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой хрена. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации NSE в анализируемых образцах.

После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация NSE в анализируемых образцах.

## 2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к NSE, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы (лиофилизированные препараты), содержащие известные количества NSE – точные концентрации указаны на этикетках флаконов – 6 фл.;
- контрольный образец (лиофилизированный препарат) с известным содержанием NSE – 1 фл.;
- конъюгат моноклональных антител к NSE с пероксидазой хрена, концентрат – 1 фл., 1,3 мл;
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;

- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 фл., 1,0 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.

### **3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

**3.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции используемых моноклональных антител к NSE с другими онкомаркерами: РЭА, ПСА, СА 15-3, СА 19-9, СА-125.

**3.2. Чувствительность.** Минимальная достоверно определяемая набором концентрация NSE в сыворотке крови человека не превышает 1 нг/мл.

**3.3. Воспроизводимость.** Коэффициент вариации результатов определения содержания NSE в одном и том же образце с использованием набора «NSE – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

**3.4. Клиническая проверка.** Концентрация NSE, измеренная в сыворотке крови 265 здоровых доноров, не превышала 13 нг/мл. Среднее значение NSE составило 4,6 нг/мл, медиана – 4,4 нг/мл.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации NSE, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

#### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**4.1.** Все компоненты набора являются нетоксичными.

*Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.*

**4.2.** При работе с набором следует соблюдать «Правила 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.).

**4.3.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**4.4.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

**4.5.** Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

**4.6.** Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор ( $H_2O_2$ , дioxлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм – 655 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре  $(25 \pm 3)^\circ C$  и 700 об/мин;

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру 2–8°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 10, 25, 50, 100, 250, 1000 и 5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 100 и 300 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

**6.1.** Иммуноферментный анализ для определения NSE проводится с использованием сыворотки крови. Центрифугировать образцы крови следует не позднее, чем через 1 час после забора крови, так как NSE содержится в форменных элементах крови и отсроченное центрифугирование может существенно завысить результаты анализа. Плазму использовать не рекомендуется, т.к. из тромбоцитов может выделяться значительное количество NSE.

**6.2.** Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°C не более 24 ч или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

*Повторное замораживание и размораживание образцов сыворотки крови не допускается.*

**6.3.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

**6.4.** Образцы сыворотки крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18–25°C не менее 30 мин.

### **7.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА**

**7.2.1.** Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

**7.2.2.** После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение 3 месяцев, но в пределах срока годности набора.

### **7.3. ПОДГОТОВКА КАЛИБРОВОЧНЫХ И КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦОВ**

Калибровочные и контрольный образцы восстановить в 400 мкл дистиллированной воды.

**Таблица расхода компонентов набора реагентов**

Количество используемых стрипов	Рабочий буферный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	ФСБ-Т, концентрат, мЛ	Дистил. вода, мЛ	Конъюгат, концентрат, мЛ	Рабочий буферный раствор, мЛ	ТМБ, концентрат мЛ	СБР, мЛ
2	4,0	до 100	0,2	2,0	0,14	2,0
3	6,0	до 150	0,3	3,0	0,21	3,0
4	8,0	до 200	0,4	4,0	0,28	4,0
5	10,0	до 250	0,5	5,0	0,35	5,0
6	12,0	до 300	0,6	6,0	0,42	6,0
7	14,0	до 350	0,7	7,0	0,49	7,0
8	16,0	до 400	0,8	8,0	0,56	8,0
9	18,0	до 450	0,9	9,0	0,63	9,0
10	20,0	до 500	1,0	10,0	0,70	10,0
11	22,0	до 550	1,1	11,0	0,77	11,0
12	24,0	до 600	1,2	12,0	0,84	12,0

Осторожно перемешать. Выдержать не менее 20 мин до полного растворения содержимого.

*Хранение:* в течение 2 недель при 2–8°C. Для дробного использования набора в течение 3 месяцев калибровочные и контрольный образцы необходимо аликвотировать и хранить при минус 20°C или ниже. Не допускать повторных циклов замораживания – оттаивания!

#### 7.4. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник при температуре 2–8°C.

*Хранение: в течение 3 месяцев при 2-8°C.*

#### 7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА

Рабочий буферный раствор приготовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз.

Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

*Хранение: до 5 суток при 2–8°C.*

#### 7.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую

ванночку для реагента внести необходимое количество рабочего буферного раствора (п. 7.5.), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

*Хранение:* до 3 часов при 18–25°C.

## 7.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

**Внимание!** *Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

*Хранение:* не более 3 часов при 18–25°C в темноте.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

**8.1.** Внести в соответствующие лунки в дублях по 25 мкл каждого калибровочного и контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение не более 15–20 мин.

**8.2.** Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 7.6.).

*Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**8.3.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин на шейкере при температуре 25°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

**8.4.** По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (п. 7.5.). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмытки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить,

постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

**8.5.** Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензида (п. 7.7.) и инкубировать на шейкере в течение 15 мин при температуре 25°C с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

*Для внесения рабочего раствора тетраметилбензида использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**8.6.** Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

## **9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты анализа регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

## 10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

*Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 25 мкл калибровочных, контрольного образцов и анализируемых сывороток крови в дублях.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 25°C, 700 об/мин.
- Промыть:** рабочим буферным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 25°C, 700 об/мин.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм /референсная длина волны 620–655 нм.

## 11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

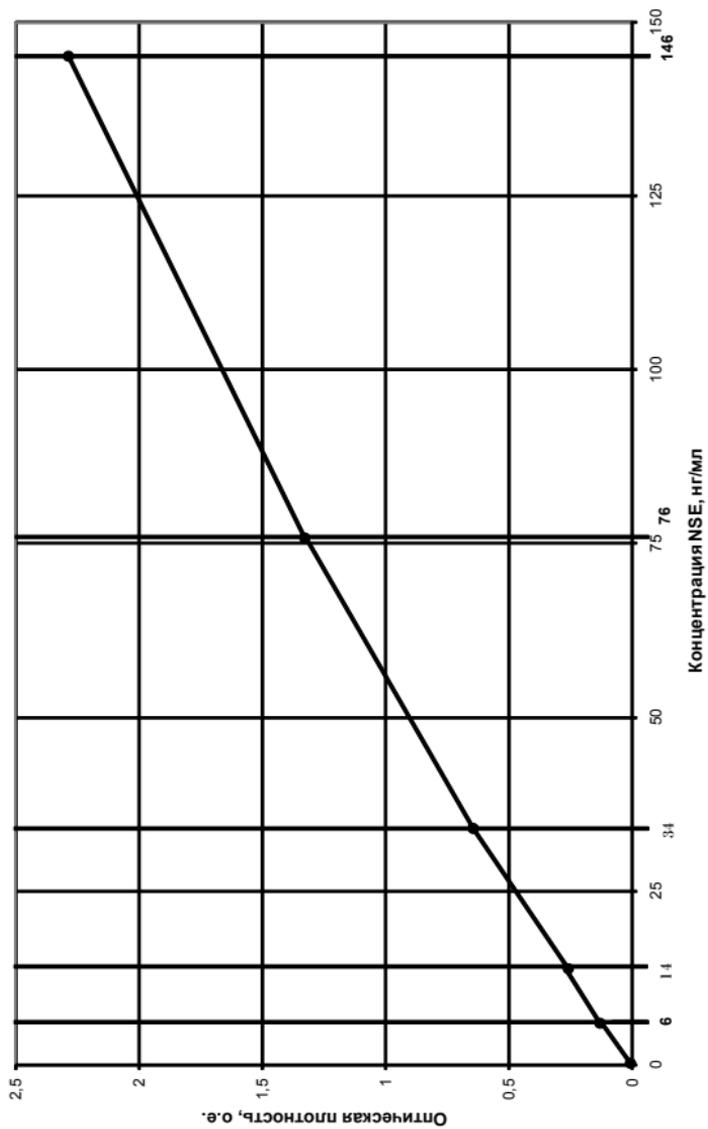
**11.1.** По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с анализируемыми образцами.

**11.2.** Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации NSE (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

**11.3.** Определить содержание концентраций в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации NSE в образце (см. пример 1).

**11.4.** Если концентрация NSE в анализируемых образцах сыворотки крови превышает концентрацию NSE в калибровочном образце с максимальным его содержанием, образцы следует развести раствором для разведения сыворо-



*Рис.* Пример зависимости оптической плотности от концентрации NSE в калибровочных образцах.

### Пример 1.

Образец, содержащий NSE	Значение ОП о.е.	Конц-ция NSE (определенная по графику)
1456нг/мл	2,288	–
76 нг/мл	1,306	–
34 нг/мл	0,642	–
14 нг/мл	0,278	–
6 нг/мл	0,129	–
0 нг/мл	0,007	–
Контрольный образец	0,398	20,6 нг/мл
Анализируемый образец	0,148	7,0 нг/мл

ток в 10 раз (20 мкл исследуемого образца + 180 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

**11.5.** Контрольный образец служит для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации NSE в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

**11.6.** При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации NSE в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

## **12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**12.1.** Набор реагентов «NSE – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

**12.2. Дробное использование набора** может быть реализовано в пределах срока годности не позднее **2 недель** с момента проведения первого ИФА при хранении калибровочных и контрольного образцов **при 2–8°C** или не позднее **3 месяцев** с момента проведения первого ИФА при хранении аликвотированных калибровочных и контрольного образцов **при минус 20°C** или ниже.

В случае дробного использования набора построение калибровочного графика и определение концентрации NSE в контрольном образце необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

**12.3.** При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или

смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

*Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.*

**12.4.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества набора  
«NSE – ИФА – БЕСТ», следует обращаться  
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:**

630559, Новосибирская область,  
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,  
тел. (383) 336-73-46, 332-67-49,  
тел./факс (383) 332-67-49,  
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

**За справками и консультацией обращаться:**  
в лабораторию ИФА гормонов и опухолевых маркеров,  
тел. (383) 227-75-41

15.03.10.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086  
на производство, хранение и реализацию  
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ  
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ  
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D  
Инфекции, передаваемые  
половым путем  
ВИЧ-инфекция  
TORCH-инфекции  
Клещевой энцефалит  
Паразитарные болезни  
Диагностика беременности  
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество  
и точный результат  
для Вашей лаборатории!***

**Наш адрес:** 630117, Новосибирск-117, а/я 492  
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)  
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,  
332-67-49, 332-67-52  
*E-mail:* [vbmarket@vector-best.ru](mailto:vbmarket@vector-best.ru)  
Internet: [www.vector-best.ru](http://www.vector-best.ru)