

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 21.02 2014 г. № 16.66/

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

05 2013 г.



по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации опухолевого маркера СА-125 в сыворотке крови
(СА-125 – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов СА-125-ИФА-БЕСТ предназначен для определения концентрации опухолевого маркера СА-125 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Опухолово-ассоциированный поверхностный антиген СА-125 представляет собой гликопротеин с высокой молекулярной массой от 200000 до 1000000 Да, синтезируемый опухолевыми клетками эпителия яичников, а также клетками, имеющими происхождение из Мюллера протока.

1.3. Определение содержания СА-125 в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики аденокарцином яичников и динамического контроля его уровня с целью оценки эффективности проводимой терапии, раннего выявления рецидивов и не диагностируемых метастазов, а также прогнозирования течения заболевания.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител к антигену СА-125. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит связывание сывороточного антигена СА-125 с моноклональными антителами к антигену СА-125, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и моноклональными антителами к СА-125, конъюгированными с пероксидазой. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором ТМБ происходит

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД
М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной.

окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации СА-125 в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА-125 в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к СА-125 человека, готовый для использования – 1 шт;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по «Liphochek Tumor Marker Control СА-125», содержащие известные количества СА-125 — 0; 15; 50; 100; 200; 400 Ед/мл; концентрации СА-125 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,4 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием СА-125, готовый для использования – 1 флакон (0,4 мл);
- конъюгат моноклональных антител к СА-125 с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (23 мл);
- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнкой для заклеивания планшета – 1 шт;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт;
- ванночкой для реагента – 2 шт;
- наконечниками для пипетки на 4 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции обоих моноклональных антител с другими онкомаркерами: РЭА, СА 19-9, СА 15-3.

3.2. Хук-эффект высоких концентраций при исследовании сывороток крови не был обнаружен до концентрации СА-125 300 000 Ед/мл.

3.3. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в сыворотках крови, содержащих гетерофильные, в том числе антимышьиные (НАМА), антитела.

3.4. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания

СА-125 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора СА-125 – ИФА – БЕСТ не превышает 8%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации СА-125 в образцах сыворотки крови при разведении их раствором для разведения сывороток имеет линейный характер в диапазоне концентраций 15-400 Ед/мл и составляет 90-100%.

3.6. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА-125 предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 50 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.7. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА-125 не превышает 1,5 Ед/мл.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация СА-125, измеренная в сыворотке крови 500 здоровых женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 18-50 лет, не превышала 35 Ед/мл.

3.9. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации СА-125, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. 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 пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми 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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 - 650 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $37 \pm 1^\circ C$ и 400-800 об/мин;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости от 5 до 350 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до $8^\circ C$ не более 5 суток или при температуре минус $20^\circ C$ (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до $25^\circ C$.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

7.2. 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 хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

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

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений. Перед использованием встряхнуть.

После первого вскрытия калибровочные и контрольные образцы можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица.

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	3,6	2,0
3	6,0	до 150	5,5	3,0
4	8,0	до 200	7,0	4,0
5	10,0	до 350	9,0	5,0
6	12,0	до 300	11,0	6,0
7	14,0	до 350	12,0	7,0
8	16,0	до 400	14,0	8,0
9	18,0	до 450	16,0	9,0
10	20,0	до 500	18,0	10,0
11	22,0	до 550	20,0	11,0
12	24,0	до 600	22,0	12,0

7.7. Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

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

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин при использовании всех лунок планшета.

7.9. Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1 °С и 650 об/мин.

7.11 По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3.). Процесс промывки повторить 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и

опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмытки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.6) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °С и 650 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации СА-125 в калибровочных образцах (Ед/мл).

9.2. Определить содержание СА-125 в контрольном образце и анализируемых пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию СА-125 умножить на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов СА-125-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (18 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- калибровочные образцы, контрольный образец, конъюгат после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для

разведения сывороток, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;
- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации СА-125 в контрольном образце.

10.3. Если концентрация СА-125 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 400 Ед/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

По вопросам, касающимся качества набора СА-125-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-Бест», тел. тел. (383) 363-20-60, тел./факс (383) 363-35-55.

Зав. лабораторией НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 Н.Н. Сорокина

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Ю. Рукавишников

Ректор ГБОУ ВПО СГМУ
им. В.И. Разумовского
Минздрава России
м.п.



В.М. Попков

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

08.10.2020 г. А.В. Масыго

