УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения РБ
_____ Н.Андросюк
«16» 06 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ CA125 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИРМА-CA125-СТ

ТУ BY 100185093.082-2020

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
_____ Д.В.Гринько
«15» 06 2020 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «10-я городская клиническая больница»
_____ В.П.Исачкин
«16» 06 2020 г.

РАЗРАБОТАНО
Директор УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»
_____ В.В.Симирский
«___» _____ 2019 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»
_____ А.В.Рожко
«___» _____ 2020 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Минский консультационно-диагностический центр»
_____ Н.М.Предко
«___» _____ 2020 г.

2020

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-СА125-СТ предназначен для определения концентрации СА125 в сыворотке крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 Онкомаркер СА125 является мукогликопротеином с молекулярной массой приблизительно 200 кДа. СА125 относится к онкофетальным белкам. Он является наиболее информативным опухолевым маркером, ассоциированным с опухолью яичников. Исследование СА125 в сыворотке крови применяют главным образом для мониторинга эпителиального рака яичников, диагностики его рецидивов, а также оценки эффективности терапии. Повышенные уровни СА125 могут наблюдаются при ряде доброкачественных и других злокачественных заболеваниях.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-моноклональные антитела к СА125, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 33 мл, общая активность не более 500 кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к СА125, готовы к использованию, 100 шт.;
- пять калибровочных проб на основе буферной системы в диапазоне концентраций СА125 (0; 15-500) Ед/мл (точные значения концентраций СА125 указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 1 флакон (калибровочная проба C_0), 10 мл и четыре флакона (калибровочные пробы C_1-C_4) по 1,0 мл. Значения концентраций СА125 в калибровочных пробах определены с использованием внутреннего стандарта;
- контрольные сыворотки КС1 и КС2 – жидкие препараты, содержащие известные количества СА125 в сыворотке крови человека (диапазоны концентраций СА125 указываются на этикетках), 2 флакона по 1,0 мл;
- концентрат промывочного раствора (КПР), жидкий препарат, 1 флакон, 50 мл.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 43 неизвестной пробы, 5 калибровочных проб и 2 проб КС, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 5 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций СА125 (0,7-500) Ед/мл.

2.5 Иммунорадиометрическое определение СА125 относится к анализам типа “сэндвич”, в котором используется два вида моноклональных антител к различным эпитопам его молекулы.

Калибровочные пробы, контрольные сыворотки и исследуемые образцы инкубируют в пробирках с иммобилизованным первым моноклональным антителом в присутствии второго моноклонального антитела, меченного йодом-125.

СА125, присутствующий в сыворотке крови человека, связывается с иммобилизованными на стенках пробирок моноклональными антителами к СА125. С СА125 связываются и меченные [^{125}I]-моноклональные антитела к СА125.

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

После инкубации содержимое пробирок удаляют. Не связавшиеся с иммобилизованным комплексом антитело-СА125 меченые антитела удаляют с помощью промывки пробирок и измеряют связанную активность [^{125}I].

Концентрацию СА125 в неизвестных образцах, прямо пропорциональную измеренной скорости счета, находят по калибровочному графику зависимости связанной активности [^{125}I] носителя от концентрации СА125 в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-моноклональные антитела к СА125 являются источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [^{125}I] – 60,1 сут.

При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее – РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к радиационной безопасности», Гигиенического норматива «Критерии оценки радиационного воздействия», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2012 № 213, с дополнением, утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2013 № 137.

ВНИМАНИЕ! Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [2], [3], [4], [5]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [6].

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

3.5 Все радиоактивные отходы, образованные в процессе использования набора собираются, хранятся и удаляются в соответствии с требованиями [8].

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)°С в течение

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

72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20°С) не более двух раз. 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)°С;
- не допускается использованиенабора 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.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [^{125}I];
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- 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%);
- пробирки пластмассовые вместимостью (3-5) мл с пробками;
- штатив для пробирок;
- колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная или деионизованная;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства.

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 ниже минус 20°С в течение трех месяцев, при температуре

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

минус 70°С – в течение двух лет. Не использовать сыворотки, которые замораживались/размораживались более двух раз.

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).

6.4 Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

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 плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8)°С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

ВНИМАНИЕ! Все реагенты стабильны при (2-8)°С до окончания срока годности набора, указанного на этикетке. Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

7.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз)

Внести в колбу плоскодонную вместимостью 1000 мл с помощью мерного цилиндра 950 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке. В случае дробного использования набора следует отобрать необходимое количество концентрата промывочного раствора и развести дистиллированной водой в 20 раз (1 мл промывочного раствора + 19 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.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к СА125 маркировать следующим образом (в дубликатах):

B_0-B_4 – для калибровочных проб СА125;

$B_{КС1}$ и $B_{КС2}$ – для КС1 и КС2;

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

B_X – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

8.2 В пробирки B_0-B_4 внести по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС1}$ и $B_{КС2}$ внести по 0,1 мл (100 мкл) контрольных сывороток КС1 и КС2. В пробирки B_X внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых сывороток крови человека.

8.3 Во все пробирки внести по 0,3 мл (300 мкл) [^{125}I]-моноклональных антител к CA125.

8.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 4 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25)°С.

8.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

8.6 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (п.Б.7.3). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки 2 раза.

После промывки в пробирках не должно оставаться следов красителя.

8.7 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

8.8 Последовательность операций анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1

<table>
<tr><td rowspan="2">Пробирки (в дубликатах)</td><td colspan="6">Последовательность операций</td></tr>
<tr><td>Калибровочные пробы, КС1 и КС2, исследуемые сыворотки крови человека, мл</td><td>[^{125}I]-моноклональные антитела к CA125, мл</td><td>Инкубировать 4 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С</td><td>Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса</td><td>Промывочный раствор мл</td><td>Сразу удалить промывочный раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки 2 раза.</td></tr>
<tr><td>B_0-B_4</td><td>0,1</td><td>0,3</td><td rowspan="3"></td><td rowspan="3"></td><td>2</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>$B_{КС1}$
$B_{КС2}$</td><td>0,1
0,1</td><td>0,3
0,3</td><td>2</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>0,1</td><td>0,3</td><td>2</td></tr>
<tr><td colspan="7">Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин</td></tr>
</table>

9 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

9.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок, в имп/мин. Из полученных значений скоростей счета вычесть среднее арифметическое значение скоростей счета в пробирках B_0.

9.2 Рассчитать величину $(B_i-B_0)/(B_4-B_0)\times100$, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки крови человека, где B_i – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_4, $B_{КС1}$, $B_{КС2}$ и B_X.

9.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения $((B_i-B_0)/(B_4-B_0))\times100$, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций Ca125, в Ед/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

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

9.4 Определить по калибровочному графику содержание CA125, в Ед/мл, в КС1 и КС2, исследуемых образцах сыворотки крови человека.

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Чувствительность

Минимальная концентрация CA125, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,7 Ед/мл.

10.2 Специфичность

Моноклональные антитела, используемые в наборе, обладают высокой специфичностью к CA125.

10.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации CA125 в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием CA125 не превышает 8%.

10.4 Тест на «открытие»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций CA125 в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольных сывороток КС1 и КС2 составляет (85-115) %.

10.5 Тест на «линейность»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций CA125 в пробах, полученных при разведении C_2 и C_4 в 2, 4, 8 раз и при умножении на коэффициент разведения составляет (85-115) %.

10.6 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИРМА-CA125-СТ концентрация CA125 в сыворотке крови здоровых лиц находится в диапазоне 0-35 Ед/мл, составляя в среднем ~ 16 Ед/мл.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Набор должен храниться при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности набора.

11.2 Срок годности набора – 60 суток.

11.3 Определение концентрации CA125 с помощью набора ИРМА-CA125-СТ проводят в сыворотке крови человека.

Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8)°С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре не менее минус 20°С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только двукратное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

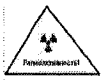
11.4 Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

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

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

11.6 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
IVD	**Изделие для диагностики in vitro**
	**Ограничение температуры** Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	**Изготовитель** Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	**Обратитесь к руководству по эксплуатации** Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	**Знак радиационной опасности** Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [^{125}I] в наборе, кБк

 УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь
Тел./факс +375-17-369-82-57 E-mail: hopmang.bel@gmail.com http://www.hopiboh.org
По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в БТК, тел. +375-17-268-87-38

Библиография

[1] Нормы МАГАТЭ по безопасности для защиты людей и охраны окружающей среды, № TS-R-1
Правила безопасной перевозки радиоактивных материалов, 2009 г

[2] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351

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

[3] 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)

[4] 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

[5] 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

[6] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»

[7] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.07.2019 № 74
О проведении обязательных и внеочередных медицинских осмотров работающих

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

[8] Санитарные нормы и правила «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при обращении с радиоактивными отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2015 г. № 142

Инструкция составлена:

сотрудниками УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»:

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

младший научный сотрудник Н.В.Михайловская

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

зам. директора по научной работе,
член-корр. НАН Беларуси, д.м.н., профессор С.А.Красный

зав. онкологической лабораторией
вирусологии, к.б.н. Е.В.Гапеенко

биолог онкологической лаборатории
вирусологии В.О.Майорова

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