REF **СН-1832** Σ **96**

И Н С Т Р У К Ц И Я
по применению набора реагентов для количественного определения антигена СА 125 методом иммуноферментного анализа (ДС-ИФА-СА 125)

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС–ИФА-СА 125» предназначен для количественного определения СА 125 в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. СА 125 – высокомолекулярный муциноподобный гликопротеин, вырабатываемый рядом эпителиальных тканей человека, является маркером аденокарциномы яичников. В организме СА 125 обнаруживается в связанной с мембранами эпителиальных клеток форме и в свободном виде во многих биологических средах (перитонеальная жидкость, цервикальная слизь, кровь, амниотическая жидкость, грудное молоко и др.). Экспрессия антигена начинается на ранних стадиях эмбриогенеза и, в норме, характерна для некоторых эпителиев в течение всей жизни.

В кровотоке здоровых людей СА 125 обнаруживается в небольшой концентрации. При онкопатологиях женской половой системы концентрация антигена значительно возрастает (в более 80% случаев при заболевании аденокарциномой яичников). Уровень маркера бывает повышен при некоторых раковых заболеваниях негинекологического характера (карцинома молочных желез, легких). Отмечены случаи повышения уровня СА 125 при воспалительных заболеваниях брюшной полости, эндометриозе.

Серийные определения концентрации СА 125 в сыворотке крови используются в мониторинге больных аденокарциномой яичников для оценки эффективности лечения и прогнозировании возможных рецидивов.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора: необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке.

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

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

В наборе «ДС-ИФА-СА 125» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум доменам молекулы СА 125: первые антитела иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках планшета во время инкубации происходит одновременное связывание содержащегося в исследуемом образце СА 125 с антителами, иммобилизованными на твердой фазе, и антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству СА 125 в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству СА 125 в образце сыворотки крови. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА 125 в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-СА 125»:

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к СА 125.	1 шт.
Конъюгат - моноклональные антитела к СА 125, конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная розового цвета жидкость.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества СА 125. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций СА 125 в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества.	6 флаконов по 0,5 мл; (Калибратор 0 – 2,0 мл)

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

Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием СА 125. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации СА 125 в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

– крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;

– одноразовые наконечники к полуавтоматическим пипеткам;

– пластиковые ванночки для жидких реагентов;

– пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 125 в сыворотке крови человека составляет 1 Ед/мл.

3.2. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции антител к СА 125 с антигенами СЕА, СА 15-9, СА 15-3.

3.3. Коэффициент вариации результатов определения СА 125 в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Точность. Определяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации СА 125 в пробе, полученной смешением равных объемов контрольной сыворотки и «Калибратора 2». Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.5. Хук-эффект высоких концентраций. В иммуноферментном анализе, основанном на «сэндвич»-принципе, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной. При использовании набора «ДС-ИФА-СА 125» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации 30000 Ед/мл.

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

3.6. Клиническая проверка. Верхний предел содержания CA 125 в сыворотке здоровых доноров около 35 Ед/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций CA 125, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.

4.2. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий.

4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.

4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгата.

4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.

4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

4.9. Промывка лунок - важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.

4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.

4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

5. Инструкция по безопасности

5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.

5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении калибраторов и контрольной сыворотки, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), р24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.

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

5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

5.4. Нельзя пипетировать ртом.

5.5. При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.

5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства или в 3% раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезактивирующего средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГс/см^2 (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГс/см^2 (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

5.11.  Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

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

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

– термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С;

– термостат (37,0 ± 1,0) °С;

– устройство для промывания планшетов (вошер);

– дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;

– дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;

– цилиндры мерные вместимостью 200 мл и 500 мл;

– стакан стеклянный вместимостью 500 мл;

– вода дистиллированная;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– перчатки резиновые или пластиковые.

7. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов с добавлением азида натрия, тимеросала или фенола в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

8. Подготовка реагентов для анализа

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8.1. Иммуносорбент. Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут.

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

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

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

8.2. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

8.3. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

8.4. Калибровочные пробы - готовы к применению.

8.5. Контрольная сыворотка - готова к применению.

8.6. ТМБ-Субстратный раствор - готов к применению.

8.7. Стоп-реагент - готов к применению.

9. Проведение анализа

9.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

9.2. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки в двух повторах внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

9.3. Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата. Стрипы планшета инкубировать в термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 30 мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С; или в термостате в течение 60 мин при температуре (37,0 ± 1,0) °С; или 90 мин при комнатной температуре (здесь 20-25 °С). Перед инкубацией без встряхивания на шейкере стрипы планшета необходимо перемешать осторожным постукиванием по краю планшета в течение 20 секунд.

9.4. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

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

9.5. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать в защищённом от света месте в течение 20 - 30 мин в зависимости от степени развития окраски.

9.6. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

11. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора не превышает 0,2.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»; «Калибратора 4»; «Калибратора 5». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации СА 125, выраженной в Ед/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят плавную калибровочную кривую.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций СА 125 в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СА 125 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

Для образца с ОП выше, чем в калибровочной пробе № 5, выдается результат: больше номинации «Калибратора 5» или этот образец должен быть протестирован в разведении (на «Калибраторе 0»). В случае разведения образца необходимо измеренную концентрацию СА 125 умножить на фактор разведения.

12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для определения СА 125 в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения СА 125 в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

12.2. При использовании двух и более планшетов, рекомендуется ставить калибровочные пробы при каждой постановке.

12.3. Нельзя касаться дна лунок.

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

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. Например, наличие гетерофильных антител у пациентов, соприкасающихся с животными, может оказывать влияние на результаты иммунологических тестов. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

13. Условия хранения и эксплуатации набора

13.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 15 месяцев.

13.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

13.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

– Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

– ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

– Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 суток при температуре от 2 до 8 °С, либо в течение 5 суток при комнатной температуре.

– Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

– Стандартные калибровочные пробы - после вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

– Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

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

– ТМБ–Субстратный раствор - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ – Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении 2 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

– Стоп-реагент - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300.

E-mail: info@npods.ru; www.npods.ru.

14. Объяснение символов

CE	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
IVD	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
LOT	Номер партии (серии)
+2°C +8°C	Температурные пределы хранения
EXP	Срок годности дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
Xi	Содержит раздражающее вещество

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

Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013

- «Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности»».
- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».
- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».

 – Изготовитель, символ 5.1.1;

 – Дата изготовления (YYYY-MM), символ 5.1.3;

 – Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD), символ 5.1.4 (взамен символа EXP);

 – Номер по каталогу, символ 5.1.6;

 – Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.2;

 – Беречь от влаги, символ 5.3.4;

 – Внимание, символ 5.4.4;

 – Содержимого достаточно для проведения *n*-количества тестов (количество определений), символ 5.5.5.

 – Содержит раздражающее вещество (символ исключен).

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