«УТВЕРЖДАЮ"
Генеральный Директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

_____А.Г. Плехов
«__» _____2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **АНТИГЕНА СА 125** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(СА 125-Имаксиз (IMAXYZ))**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА 125-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации антигена СА 125 в сыворотке крови человека.

СА 125 относится к онкофетальным белкам и является мукогликопротеином с молекулярной массой более 200 кДа. В норме у взрослых СА 125 присутствует в организме в двух формах – мембранносвязанной и свободной. Связанный антиген выявляется на поверхности эпителиальных клеток фаллопиевых труб, эндометрия, шейки матки, потовых желез, молочных желез, бронхов. В свободной форме он обнаруживается в высоких концентрациях в семенной жидкости, грудном молоке, влагалищных выделениях, слюне, плевральной, бронхоальвеолярной и внутрибрюшинной жидкостях. В кровотоке СА 125 присутствует в низких концентрациях. Увеличение концентрации СА 125 в сыворотке крови свидетельствует о различных патологиях яичников: как злокачественном перерождении ткани яичника, так и о доброкачественных заболеваниях. Повышение содержания СА 125 в сыворотке крови может происходить при беременности, во время менструаций, при доброкачественных опухолях матки, эндометриозе, раке тела и шейки матки, фаллопиевых труб, при воспалительных процессах в брюшной полости, а также при ряде злокачественных негинекологических заболеваний

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

поджелудочной железы, легких, желудочно-кишечного тракта. Определение СА 125 в сыворотке крови используется при мониторинге больных с установленным раком яичников – для оценки эффективности выбранного лечения, раннего выявления рецидивов и бессимптомно протекающего метастазирования резидуальной опухоли. Диагностическая значимость метода в значительной мере зависит от гистологического типа опухоли, она максимальна в случае серозных карцином яичников, по сравнению с остальными карциномами, и в частности, муцинозными карциномами. Корреляция между уровнем СА 125 в сыворотке и течением заболевания составляет 87%. Постоянное увеличение значений СА 125 может быть связано со злокачественностью заболевания и низким ответом на терапию, тогда как снижение уровня СА 125 может указывать на хорошую реакцию на лечение.

1.2. Набор «СА 125-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «СА 125-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к СА 125. Другие моноклональные антитела к СА 125 конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание СА 125, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и взаимодействие связавшегося СА 125 с моноклональными антителами, меченными пероксидазой. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к

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

СА 125, что позволяет использовать их для реализации одностадийного высокоспецифичного анализа.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержавшими СА 125. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации СА 125 в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках проводится расчет концентрации СА 125 в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ — **1 упаковка**

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованными мышиными моноклональными антителами к СА 125, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к СА 125».

КОНЪЮГАТ — **1 флакон, 14 мл**

Конъюгат моноклональных антител к СА 125 с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП) — **комплект**

Содержат известные количества СА 125.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **0** Ед/мл СА 125, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **20** Ед/мл СА 125, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **100** Ед/мл СА 125, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **200** Ед/мл СА 125, маркирован «Калибровочная проба №4».

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

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **500** Ед/мл СА 125, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит **1000** Ед/мл СА 125, маркирован «Калибровочная проба №6».

ПРИМЕЧАНИЕ: точные номиналы калибровочных проб указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС) **1 флакон, 0,5 мл**

Маркирован «Контрольная сыворотка», содержит известное количество СА 125, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ **1 флакон, 3,0 мл**

образцов сыворотки крови,

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р»

РАСТВОР ТМБ **1 флакон, 14 мл**

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ **1 флакон, 14 мл**

1М соляная кислота (HCl), маркирован «Стоп-реагент».

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР. **1 флакон, 20 мл**

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

Дополнительно в состав набора могут входить:

- защитная пленка для микропланшетов;
- пластиковые ванночки для реактивов;
- одноразовые наконечники;
- полиэтиленовый пакет с замком для хранения микропланшета.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 125 в сыворотке крови человека не превышает 1,6 Ед/мл.

4.2. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител (иммобилизованного и конъюгированного с пероксидазой) с антигенами: РЭА, СА 19-9, СА 15-3, СА 72-4.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 125 в образцах сыворотки крови при разведении «Буфером Р», имеет линейный

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

характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

4.4. Точность. Соответствие измеренной концентрации СА 125 в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.5. Коэффициент вариации результатов определения СА 125 в одном и том же образце с использованием набора «СА 125-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборе реагентов «СА 125-Имаксиз (IMAXYZ)» хук-эффект не обнаружен до концентрации 20000 Ед/мл.

4.7. Набор реагентов содержит специальные добавки, позволяющие исключить влияние на результаты анализа анти-мышиных антител (HAMA) и гетерофильных антител. Однако чрезвычайно высокие концентрации HAMA и гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

4.8. Клиническая проверка. У 99% здоровых женщин уровень СА 125 не превышает 35 Ед/мл.

Измерение концентрации СА 125 не может использоваться в качестве скринингового теста для постановки диагноза, а результат измерения не является основанием для назначения какой-либо терапии без подтверждения другими клиническими исследованиями.

Уровни СА 125 ниже 35 Ед/мл не подтверждают отсутствие онкопатологии, поскольку пациенты с гистологически подтвержденной резидуальной карциномой яичников могут иметь концентрации СА 125 такие же, как у здоровых лиц. Изменения концентрации СА 125, наблюдаемые при мониторинге пациентов с раком яичников, должны оцениваться совместно с другими клиническими методами мониторинга таких пациентов.

При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций СА 125, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной in vitro диагностики.

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

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, необходимо с калибраторами, контрольными материалами обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°С, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инактивированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.8. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

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

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.
- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.
- Термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание при температуре +37°С со скоростью 400 - 650 об/мин.
- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.
- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизованной, мутной или гиперлипемичной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азида натрия.

7.4. Если предполагается транспортировка образцов, сыворотка должна быть отделена от кровяного сгустка перед транспортировкой.

7.5. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение **48 часов** с момента получения при условии их хранения при +2...8°С. Для

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

более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°С. Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°С).

8.2. Предварительное разведение исследуемых образцов. Если значения СА 125 в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером Р в 20 раз:

- 190 мкл Буфера Р + 10 мкл исследуемого образца.

Тщательно перемешать.

8.3. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°С) не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

8.4. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

8.5. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера П развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Готовый к использованию Промывочный буфер хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°С) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный «Буфер П» хранить закрытым при температуре +2...8°С в течение всего срока годности

8.6. Конъюгат анти-СА 125-пероксидаза готов к использованию.

8.7. Раствор ТМБ готов к использованию.

8.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8.9. Буфер Р готов к использованию.

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

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 100 мкл Конъюгата.

9.3. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 25 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.*

9.4. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 400 – 650 об/мин.

9.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.5, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

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

9.6. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.7. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 2**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках А1 и А2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации СА 125 в калибровочных пробах (Ед/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. Определить содержание СА 125 в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА 125 умножить на фактор разведения.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них СА 125. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации СА 125 в образцах сывороток пациентов:

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

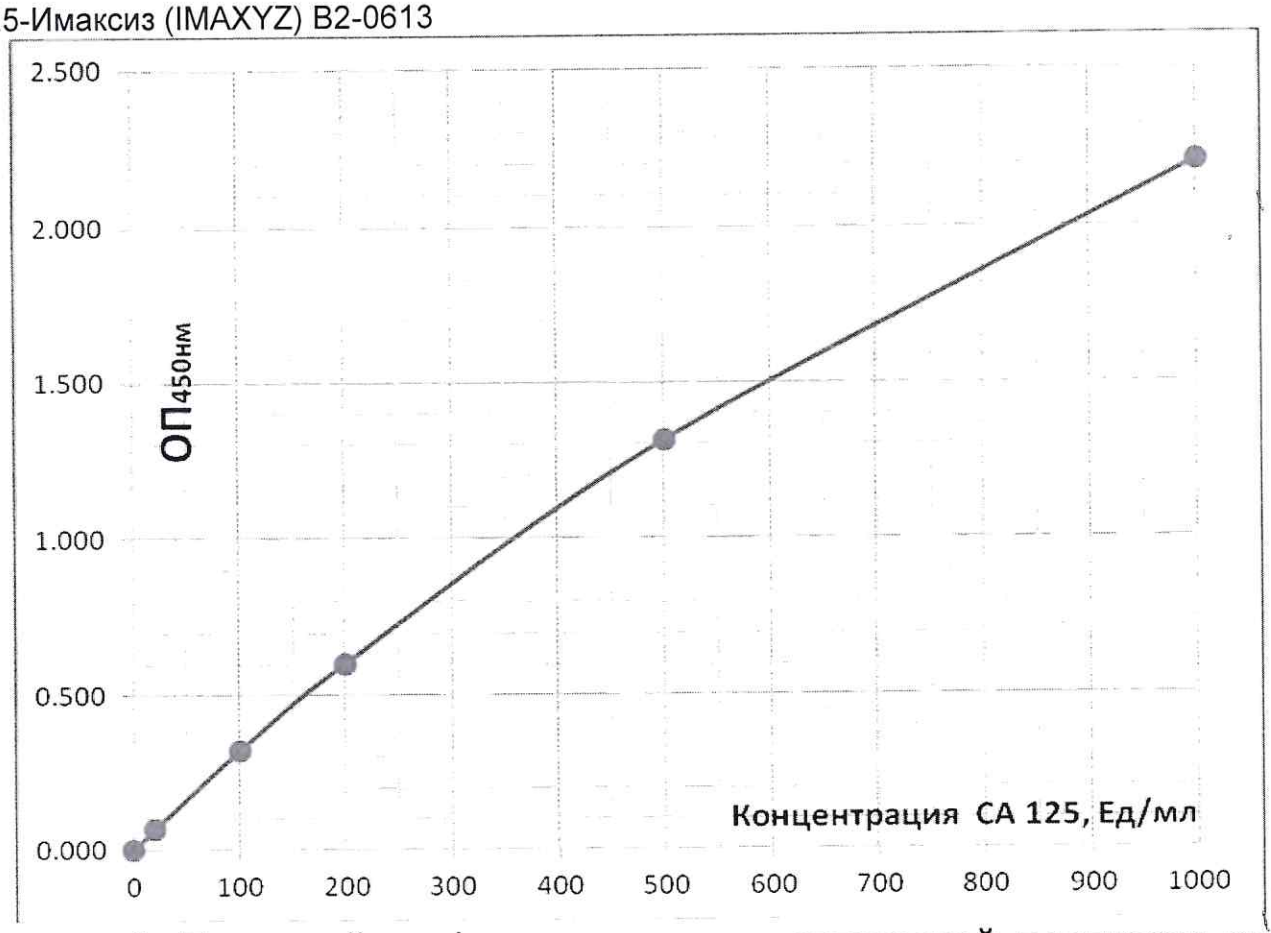


Рисунок 1. Типичный график зависимости оптической плотности от концентрации ТТГ.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента настоятельно рекомендуется построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре +2...8°С.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего

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

срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора — 18 месяцев. Не допускается использование серии набора по истечении срока ее годности.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°С;
- Калибровочные пробы, «Буфер Р» и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°С;
- «Буфер П» и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.
- Промывочный буфер, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°С). Не добавлять в емкость с используемым промывочным буфером вновь приготовленный раствор.

13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

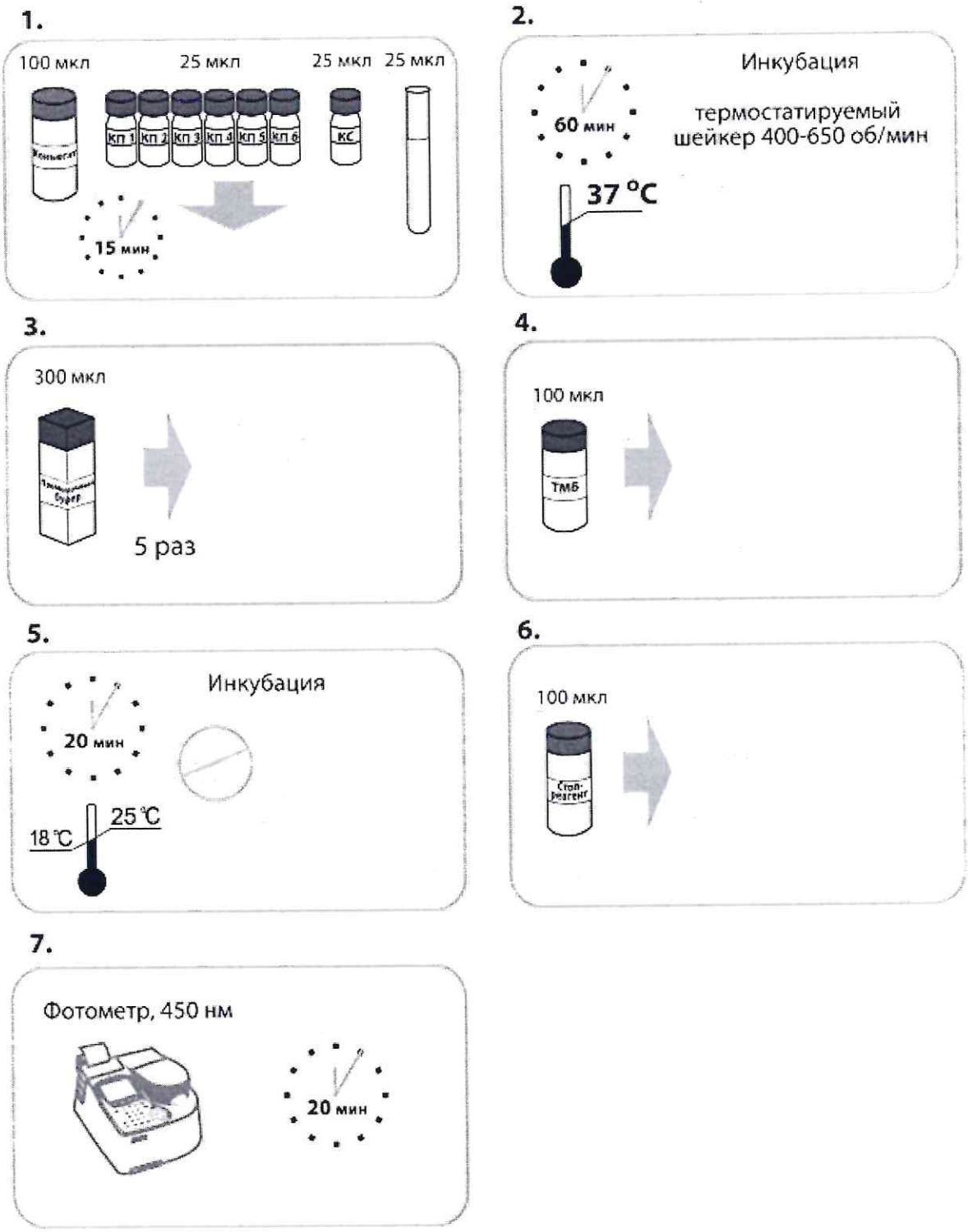
14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

14.1. Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г».

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 2.



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

По вопросам качества набора обращаться в АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194356, Санкт-Петербург, Дорога в Каменку, д. 56, лит. А, тел./факс (812) 250-55-10, 8(800) 200-23-24 или в НОЦ «Институт лабораторной медицины» ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ по адресу: 197087, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.6/8, тел. (812) 233-97-26.

Генеральный директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» А.Г. Плехов

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