

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СА125  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА  
ИФА-СА125

ТУВУ 100185093.081-2020

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-СА125 предназначен для определения концентрации СА125 в сыворотке крови человека методом иммуноферментного 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 (плазме) крови применяют главным образом для мониторинга эпителиального рака яичников, диагностики его рецидивов, а также оценки эффективности терапии. Повышенные уровни СА125 могут наблюдаться при ряде доброкачественных и других злокачественных заболеваниях.

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

### 2.1 Состав набора:

- иммуносорбент - 96-луночный стриповый полистирольный планшет, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок с иммобилизованными моноклональными антителами к СА125, готов к использованию, 1 планшет;

- конъюгат моноклональных антител к СА125 с пероксидазой хрена, готов к использованию, 1 флакон, (7,0±0,5) мл, прозрачная жидкость оранжевого цвета;

- шесть калибровочных проб на основе буферной системы, в диапазоне концентраций СА125 (0; 25-400) Ед/мл (точные значения концентраций СА125 указываются на этикетках флаконов) – готовы к использованию, 1 флакон (калибровочная проба С<sub>0</sub>), (6±0,5) мл и пять флаконов (калибровочные пробы С<sub>1</sub>-С<sub>5</sub>) по (0,8±0,1) мл, прозрачные жидкости розового цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость). Значения концентраций СА125 в калибровочных пробах определены с использованием внутреннего стандарта;

- контрольные сыворотки (КС1 и КС2) на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества СА125 (диапазоны концентраций СА125 указываются на этикетках), готовы к использованию, 2 флакона по (0,8±0,1) мл, прозрачные жидкости желтого или светло-желтого цвета;

- концентрат промывочного раствора (КПР) (солевой раствор с твин-20), 1 флакон, (45±1,0) мл, прозрачная бесцветная жидкость;

- ТМБ-субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в растворе, содержащем перекись водорода), готов к использованию, 1 флакон, (14±1,0) мл, прозрачная бесцветная жидкость;

- стоп-реагент (раствор серной кислоты), готов к использованию, 1 флакон, (14±1,0) мл, прозрачная бесцветная жидкость;

- пленка для заклеивания планшета, 2 шт.

Примечание:

ТМБ-субстрат может не входить в состав набора. В этом случае в состав набора входят субстратный буферный раствор (СБР), готов к использованию, 1 флакон (7,0±0,5) мл и раствор ТМБ, готов к использованию, 1 флакон, (1,0±0,1) мл, прозрачные бесцветные жидкости.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 40 неизвестной пробы, 6 калибровочных проб и 2 проб КС, всего 96 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций СА125 (0,8-400) Ед/мл.

2.5 Иммуноферментное 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 лунках полистирольного планшета с иммобилизованным первым моноклональным антителом в присутствии второго моноклонального антитела, меченого пероксидазой хрена.

СА125, присутствующий в сыворотке крови человека, связывается с иммобилизованными на стенках лунок моноклональными антителами к СА125. С СА125 связываются и меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела к СА125.

После инкубации содержимое лунок удаляют. Не связавшиеся с иммобилизованным комплексом антитело-СА125 меченые антитела удаляют с помощью промывки лунок планшета. После отмытия несвязанных компонентов в лунки планшета добавляют раствор проявителя (ТМБ-субстрат). Пероксидазную реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450 нм, которая пропорциональна концентрации СА125 в исследуемых образцах.

### 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 Присутствие в наборе ИФА-СА125 химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора.

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 [1], [2], [3], [4]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [5].

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

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

3.6 Все отработанные растворы, подлежащие утилизации, необходимо обрабатывать 6% раствором перекиси водорода и выдерживать при комнатной температуре в течение 3 ч.

3.7 Все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и автоклавировать в течение 1 ч при температуре  $(126 \pm 2)$  °С и давлении  $(0,15 \pm 0,02)$  МПа.

3.8 Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо обрабатывать 70% этиловым спиртом либо дезинфицирующими средствами.

#### 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 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 использование набора 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;
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;

- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- не допускается проведение анализа в присутствии паров перекиси водорода, кислот, щелочей, альдегидов, хлорсодержащих соединений, а также пыли, которые могут снижать ферментативную активность конъюгата;
- ферментная реакция очень чувствительна к ионам металлов, поэтому не допускается контакт реагентов с металлами;
- ТМБ-субстрат перед использованием должен быть бесцветным, при его окрашивании необходимо заменить на новый;
- не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и ТМБ-субстрата.

## 5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- спектрофотометр вертикального сканирования;
- суховоздушный термостат, поддерживающий температуру  $(37 \pm 2)$  °С;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов, 8-ми или 12-ти канальное;
- 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%);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,30 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность должна быть не более 3%) или аналогичные им;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- цилиндры мерные вместимостью 10; 25; 100; 500; 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- стаканы химические мерные вместимостью 25; 500; 1000 мл;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- пробирка одноразовая с пробкой вместимостью 4 мл;
- штатив для пробирок;
- флакон пластмассовый вместимостью 20 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перекись водорода 6 %;

- спирт этиловый 70 %;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

## 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 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).

## 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 защищенном от света месте в плотно закрытой первичной упаковке следующим образом:

- оставшиеся стрипы необходимо тщательно заклеить пленкой для заклеивания планшета и хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;

- конъюгат, ТМБ-субстрат, стоп-реагент, концентрат промывочного раствора после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора;

- калибровочные пробы и контрольные сыворотки после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре (2-8) °С не более 2 месяцев.

**ВНИМАНИЕ!** Не используйте компоненты из аналогичных наборов других серий.

7.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз)

Внести в стакан химический мерный вместимостью 1000 мл с помощью цилиндра мерного 855 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с КПР 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.

#### 7.4 Приготовление хромоген-субстратного раствора

В чистый флакон вместимостью 20 мл отобрать 0,35 мл (350 мкл) раствора ТМБ, добавить 7,0 мл СБР и тщательно перемешать.

**ВНИМАНИЕ!** Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием.

Примечание – Приготовление хромоген-субстратного раствора требуется только в том случае, если раствор ТМБ и СБР поставляются в виде отдельных компонентов.

Таблица 1 – Расход реагентов набора

Количество стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	ТМБ-субстрат, мл	Стоп-реагент, мл
	КПР, мл	Дист. вода, мл			
1	3	50	0,5	1	1
2	5	100	1	2	2
3	8	150	1,5	3	3
4	11	200	2,0	4	4
5	13	250	2,5	5	5
6	16	300	3,0	6	6
7	18	350	3,5	7	7
8	21	400	4,0	8	8
9	24	450	4,5	9	9
10	26	500	5,0	10	10
11	29	550	5,5	11	11
12	32	600	6,0	12	12

## 8 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

8.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматическое или полуавтоматическое устройство для промывания планшетов – вошер, в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-ми канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них, лунки должны заполняться промывочным раствором ((0,300-0,350) мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- промывочный раствор должен находиться в лунках не менее 40 с;

- после последней аспирации в лунках не должно быть остатков жидкости. При необходимости удалить остатки влаги, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге;

Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

## 9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9. Перед началом работы вскрыть пакет с иммуносорбентом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Составить протокол маркировки лунок, из расчета, что калибровочные пробы (маркировка лунок В<sub>0</sub>-В<sub>5</sub>), контрольные сыворотки (маркировка лунок КС1 и КС2), все образцы исследуемых сывороток крови человека (маркировка лунок В<sub>х</sub>), ставятся в дубликатах.

9.2 В лунки планшета внести по 0,05 мл (50 мкл):

- калибровочных проб С<sub>0</sub>-С<sub>5</sub> – каждая калибровочная проба в отдельные, предназначенные для нее лунки;
- контрольных сывороток (КС1 и КС2) – в предназначенные для них лунки;
- образцов исследуемых сывороток крови человека.

**ВНИМАНИЕ!** Общее время внесения калибровочных проб, контрольных сывороток и образцов исследуемых сывороток не должно превышать 15 мин, иначе время инкубации разных образцов будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

9.3 Во все лунки внести по 0,05 мл (50 мкл) конъюгата. Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.

9.4 Планшет заклеить пленкой и инкубировать при температуре +37 °С в течение 60 мин.

9.5 Удалить содержимое из всех лунок с помощью вошера или 8-ми канальной пипетки, промыть все лунки планшета 5 раз по 0,3 мл (300 мкл) промывочным раствором, приготовленным по п. 7.3, и после последней аспирации удалить остатки влаги, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.6 Во все лунки внести по 0,1 мл (100 мкл) ТМБ-субстрата. Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.

9.7 Планшет инкубировать при температуре (18-25) °С в темном месте в течение (10-20) мин (в зависимости от степени развития окраски).

9.8 Остановить цветную реакцию путем внесения во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента (в той же последовательности, что и ТМБ-субстрат). Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.

9.9 Сразу после остановки цветной реакции определить оптическую плотность (ОП) в лунках при длине волны 450 нм.

В случае невозможности (по техническим причинам) своевременно измерить ОП в лунках, планшет допускается хранить при температуре (2-8) °С не более 15 мин.

9.10 Последовательность операций анализа приведена в таблице 2.

Таблица 2

Лунки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибр. пробы; КС и подготовленные исследуемые сыворотки крови человека, мкл	Конъюгат мкл	Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.	Планшет заклеить пленкой и инкубировать при +37 °С в течение 60 мин
В <sub>0</sub> -В <sub>5</sub>	50	50		
КС1 и КС2	50	50		
В <sub>х</sub>	50	50		

Продолжение таблицы 2

Лунки (в дубликатах)	Последовательность операций						
	С помощью вошера или 8-ми канальной пипетки	Промывочный раствор мкл	Удалить промывочный раствор.  Повторить 4 раза стадию промывки.	ТМБ-субстрат мкл	Перемешать содержимое лунок (5-6) круговыми движениями по поверхности стола.	Планшет инкубировать при (18-25) °С в темном месте в течение (10-20) мин без встряхивания.	Стоп-реагент, мкл
В <sub>0</sub> -В <sub>5</sub>	удалить содержимое	300		100			100
КС1 и КС2		300		100			100
В <sub>х</sub>		300		100			100

Сразу после остановки цветной реакции измерить ОП при длине волны 450 нм

## 10 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

10.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП, в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы (В<sub>0</sub>-В<sub>5</sub>), контрольные сыворотки (В<sub>КС1</sub> и В<sub>КС2</sub>), исследуемые образцы сыворотки крови (В<sub>х</sub>).

10.2 Построить калибровочный график в линейных или полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в ОЕ, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентрации СА125, в Ед/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

10.3 Определить по калибровочному графику содержание СА125, в Ед/мл, в КС1 и КС2. Содержание СА125 в КС1 и КС2 должно соответствовать указанному на этикетке.

10.4 По калибровочному графику определить содержание СА125, в Ед/мл, в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

## 11 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 11.1 Чувствительность

Минимальная концентрация СА125, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,8 Ед/мл.



## 11.2 Специфичность

Моноклональные антитела, используемые в наборе, обладают высокой специфичностью к СА125.

## 11.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений ( $n=10$ ) концентрации СА125 в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием СА125 не превышает 8 %.

## 11.4 Тест на «открытие»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций СА125 в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольных сывороток КС1 и КС2 составляет (80-120) %.

## 11.5 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИФА-СА125 концентрация СА125 в сыворотке крови здоровых лиц находится в диапазоне 0-35 Ед/мл, составляя в среднем ~ 13 Ед/мл.

## 12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

Замораживать компоненты набора запрещается.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев.

12.3 Определение концентрации СА125 с помощью набора ИФА-СА125 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.

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

12.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

### Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
<b>SN</b>	<b>Серийный номер</b> Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	<b>Использовать до</b> 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
<b>IVD</b>	<b>Изделие для диагностики in vitro</b>
	<b>Ограничение температуры</b> Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	<b>Изготовитель</b> Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	<b>Обратитесь к руководству по эксплуатации</b> Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия
	<b>Содержимого достаточно для проведения n-тестирований</b> Настоящий символ сопровождается указанием количества определений

 УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3,  
220141, г. Минск, Республика Беларусь  
Тел./факс +375-17-272-52-57 E-mail: [hopmang.bel@gmail.com](mailto:hopmang.bel@gmail.com)  
<http://www.hopiboh.org>  
По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК, тел. +375-17-396-87-38

## Библиография

- [1] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
- [2] 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)
- [3] 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
- [4] 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
- [5] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165  
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»
- [6] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 26.04.2011 г. № 31  
«Об утверждении инструкции о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих и признании утратившими силу некоторых Постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь»