

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Руководитель Департамента  
государственного контроля  
лекарственных средств,  
изделий медицинского назначения  
и медицинской техники МЗ РФ  
\_\_\_\_\_ В.Е. Акимочкин  
«24» декабря 2003 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ  
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**АНТИГЕНА СА 125**  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
**(ОнкоИФА-СА 125)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа  
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 8 от 22 сентября 2003 г.)

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов ОнкоИФА-СА125 предназначен для количественного определения содержания антигена СА125 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** СА125 относится к онкофетальным белкам. СА125 является мукогликопротеином с молекулярной массой выше 200кДа. В норме у взрослых СА125 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 СА125 присутствует в низких концентрациях. Увеличение концентрации СА125 в сыворотке крови свидетельствует о различных патологиях яичников: как злокачественном перерождении ткани яичника, так и при доброкачественных заболеваниях. Повышение содержания СА125 в сыворотке крови может происходить также 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 — поджелудочной железы, легких, желудочно-кишечного тракта.

Определение СА125 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.

**1.3.** Набор ОнкоИФА-СА125 рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

В наборе ОнкоИФА-СА125 использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к СА125. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-СА125-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация СА125, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-СА125-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации СА125. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству СА125 в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству СА125 в исследуемом образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА125 в исследуемых образцах.

## **3. СОСТАВ НАБОРА:**

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к СА125, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к СА125» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, содержащие известные количества СА125; значения концентрации СА125 в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов; калибровочная проба №1 (0 Ед/мл)— 1 флакон (3,0 мл) и калибровочные пробы №2–№6—5 флаконов (по 0,5мл);
- конъюгат анти-СА125-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «БуферР» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- «Стоп-реагент» (1Н соляная кислота) — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием СА125, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

## **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

**4.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с раковыми антигенами: РЭА, СА 19-9, СА 15-3, СА 72-4.

**4.2. Коэффициент вариации результатов определения СА125 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ОнкоИФА-СА 125 не превышает 8%.**

**4.3. Линейность.** Зависимость концентрации СА125 в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой, не содержащей СА125, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет  $\pm 10\%$ .

**4.4. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» CA125 — соответствие измеренной концентрации CA125 предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

**4.5. Чувствительность.** Минимальная достоверно определяемая набором концентрация CA 125 в сыворотке крови человека не превышает 5 Ед/мл.

**4.6. Хук-эффект высоких концентраций.** В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ОнкоИФА-CA125 хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации CA125 30 000 Ед/мл.

**4.7. Клиническая проверка.** Диапазон значений концентраций CA125 до 35 Ед/мл определяется как нормальный. Концентрация CA125 повышена у 50% женщин с первичным раком яичников и у 80% женщин с метастатическим раком яичников.

**4.8.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций CA125, соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**5.3.** При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**5.5.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**5.6.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

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

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

· Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при комнатной температуре (+18...25°C);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

**7.1.** Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2.** Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения CA125 в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения калибровочной пробы №6, образцы следует развести калибровочной пробой №1 (0 Ед/мл) в 30 раз и в 900 раз:

Образец №1 (разведение в 30 раз): 290мкл калибровочной пробы №1 + 10 мкл исследуемого образца.

Образец №2 (разведение в 900 раз): 290 мкл калибровочной пробы №1 + 10 мкл Образца №1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

**7.3.** Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.4.** Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10раз.  
Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.5.** Конъюгат анти-CA125-пероксидаза готов к использованию.

**7.6.** Раствор ТМБ готов к использованию.

**7.7.** Стоп-реагент готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;

C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;

D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;

E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;

F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;

G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;

H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

**8.3.** Во все лунки внести, кроме лунок A1 и A2, по 150 мкл раствора конъюгата E.

**8.4.** Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**8.5.** Инкубировать стрипы в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере со скоростью 500–800 оборотов в минуту.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.4, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

**8.8.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минуты.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину  $V$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить калибровочный график зависимости  $V$  (ед.опт.плотн.) от концентрации CA125 в калибровочных пробах (Ед/мл).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой  $B-B_T$ , где  $B_T$  — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание СА125 в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию СА125 умножить на фактор разведения.

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при температуре +2...8°C.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**9.1.** Набор ОнкоИФА-СА125 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2..8°C в течение всего срока годности.

**9.2.** Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

**9.3.** Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

**9.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации СА125 в контрольной сыворотке.

**9.5.** Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора ОнкоИФА-СА125 следует обращаться в ЗАО «Алкор Био» по адресу: г.Санкт-Петербург, пос. Песочный-2, ул.Ленинградская, д.70/4, тел/факс: (812) 596-67-80 или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, г. Москва, Научный проезд, д.14А, телефон: (095) 120-60-95.**

#### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-СА125-пероксидаза, мкл	–	150	150	150	150	150	150	150	150
КП № 1, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация № 1	2 часа, шейкер, КТ								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

#### **Примечания:**

- КП — калибровочная проба;*
- КС — контрольная сыворотка;*
- С<sub>х</sub> — анализируемые пробы;*
- ОП — оптическая плотность;*
- КТ — комнатная температура (+18...25°C).*

Инструкция разработана:

В.А.Головаченко, зав.лабораторией ЗАО «АлкорБио»,  
к.б.н. Д.Г.Полынцевым, ген. директором ЗАО «Алкор Био»;  
к.м.н. Н.Н. Ткаченко, сотрудником НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН.