

ВЕКТОР



Набор реагентов  
для иммуноферментного определения  
концентрации опухолевого маркера СА-125  
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

СА-125 – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**T-8466**



## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА-125 – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации опухолевого маркера СА-125 в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Опухолово-ассоциированный поверхностный антиген СА-125 представляет собой гликопротеин с высокой молекулярной массой от 200000 до 1000000 Да, синтезируемый опухолевыми клетками эпителия яичников, а также клетками, имеющими происхождение из Мюллерова протока. У 95–99% взрослых здоровых женщин концентрация СА-125 в сыворотке крови не превышает 35 Ед/мл.

1.3. Количественное определение содержания СА-125 в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики аденокарцином яичников и динамического контроля его уровня с целью оценки эффективности проводимой терапии, раннего выявления рецидивов и недиагностируемых метастазов, а также прогнозирования течения заболевания.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и одного контрольного образца в дублях при одновременном использовании всех стрипов планшета.

## 2. ПРИНЦИП МЕТОДА

### 2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на одностадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител к антигену СА-125. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации происходит связывание сывороточного антигена СА-125 с моноклональными антителами к антигену СА-125, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и моноклональными антителами к СА-125, конъюгированными с пероксидазой. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации СА-125 в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрации СА-125 в анализируемых образцах.

### 2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к СА-125 человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы, аттестованные «Liphocheck Tumor Marker Control СА-125», содержащие известные

количества СА-125 – 0; 15; 50; 100; 200 и 400 Ед/мл; концентрации СА-125 в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 фл. по 0,4 мл;

- контрольный образец с известным содержанием СА-125, готовый для использования – 1 фл., 0,4 мл;
- конъюгат моноклональных антител к СА-125 с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл., 25 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

### **3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**3.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с другими онкомаркерами: РЭА, СА 19-9, СА 15-3.

**3.2. Воспроизводимость.** Коэффициент вариации результатов определения содержания СА-125 в одном и том же образце с использованием набора «СА-125 – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

**3.3. Хук-эффект высоких концентраций.** При использовании набора «СА-125 – ИФА – БЕСТ» хук-эффект не обнаружен до концентрации СА-125 30000 Ед/мл.

**3.4. Линейность.** Отклонение от расчетной величины концентрации СА-125 при разведении анализируемых проб раствором для разведения сывороток не превышает 10% в диапазоне концентраций 15–400 Ед/мл.

**3.5. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» СА-125 – соответствие измеренной концентрации СА-125 предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочной пробы 50 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

**3.6. Чувствительность.** Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА-125 не превышает 2 Ед/мл.

**3.7. Клиническая проверка.** Концентрацию СА-125, измеренная в сыворотке крови

500 здоровых женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 18–50 лет, не превышала 35 Ед/мл. Средняя концентрация СА-125 составила 6,0 Ед/мл.

**3.8.** Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации СА-125, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

#### **4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**4.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

**4.2.** Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. *В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.*

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

**4.4.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует

рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

**4.7.** Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор ( $H_2O_2$ , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  и 650 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 350 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–30 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

**6.1.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

**6.2.** Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°C не более 24 ч или при температуре минус 20°C не более 3 мес.

Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

**6.3.** Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин при температуре 18–25°C.

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

**7.1.** Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

**7.2.** Калибровочные пробы, контрольный образец, конъюгат, раствор тетраметилбензидина и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

### **7.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА**

**7.3.1.** Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

**7.3.2.** После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

#### 7.4. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

*Хранение:* при температуре от 2 до 8°C в течение 1 месяца.

#### 7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор готовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

*Хранение:* до 5 суток при 2–8°C.

**Таблица расхода компонентов набора реагентов.**

| Количество<br>используемых<br>стрипов | Конъюгат,<br>мл | Раствор<br>ТМБ,<br>мл | Промывочный<br>раствор     |                        |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|
|                                       |                 |                       | Концентрат<br>ФСБ-Т,<br>мл | Дистил.<br>вода,<br>мл |
| 2                                     | 4,0             | 2,0                   | 4,0                        | до 100                 |
| 3                                     | 6,0             | 3,0                   | 6,0                        | до 150                 |
| 4                                     | 8,0             | 4,0                   | 8,0                        | до 200                 |
| 5                                     | 10,0            | 5,0                   | 10,0                       | до 250                 |
| 6                                     | 12,0            | 6,0                   | 12,0                       | до 300                 |
| 7                                     | 14,0            | 7,0                   | 14,0                       | до 350                 |
| 8                                     | 16,0            | 8,0                   | 16,0                       | до 400                 |
| 9                                     | 18,0            | 9,0                   | 18,0                       | до 450                 |
| 10                                    | 20,0            | 10,0                  | 20,0                       | до 500                 |
| 11                                    | 22,0            | 11,0                  | 22,0                       | до 550                 |
| 12                                    | 24,0            | 12,0                  | 24,0                       | до 600                 |

### 7.6. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

## 7.7. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов), отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ плюс.

Остатки раствора тетраметилбензида из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ*).

**Внимание!** Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

**8.1.** Внести в соответствующие лунки в дублях по 25 мкл каждой калибровочной пробы и по 25 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 25 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15–20 мин.

**8.2.** Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (п. 7.6.).

*Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые накопечники, входящие в состав набора. Остатки конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом!).*

**8.3.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

**8.4.** По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.5.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо*

*добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.*

**8.5.** Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (п. 7.7.), заклеить планшет пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

*Для внесения раствора тетраметилбензида использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора. Остатки раствора ТМБ утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ!).*

**8.6.** Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

## **9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты анализа регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

## 10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА

*Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 25 мкл калибровочных проб и контрольного образца в дублях;  
по 25 мкл анализируемых образцов в дублях.
- Внести:** по 200 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

## 11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

**11.1.** По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с анализируемыми образцами.

**11.2.** Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации СА-125 (ось абсцисс) в калибровочных пробах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждой калибровочной пробы отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

**11.3.** Определить содержание концентраций в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации СА-125 в образце (см. пример 1).

**11.4.** Если концентрация СА-125 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 400 Ед/мл, образец следует развести раствором

### Пример 1

| Калибровочная проба, содержащая СА-125 | Значение ОП о.е. | Конц-ция СА-125 (определенная по графику), Ед/мл |
|--|------------------|--|
| 400 Ед/мл                              | 2,9              | -  |
| 200 Ед/мл                              | 1,59             | -  |
| 100 Ед/мл                              | 0,84             | -  |
| 50 Ед/мл                               | 0,404            | -  |
| 15 Ед/мл                               | 0,118            | -  |
| 0 Ед/мл                                | 0,008            | -  |
| Контрольный образец                    | 0,289            | 35,8   |
| Анализируемый образец                  | 0,766            | 92,0   |

для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

**11.5.** Контрольный образец служит для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СА-125 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

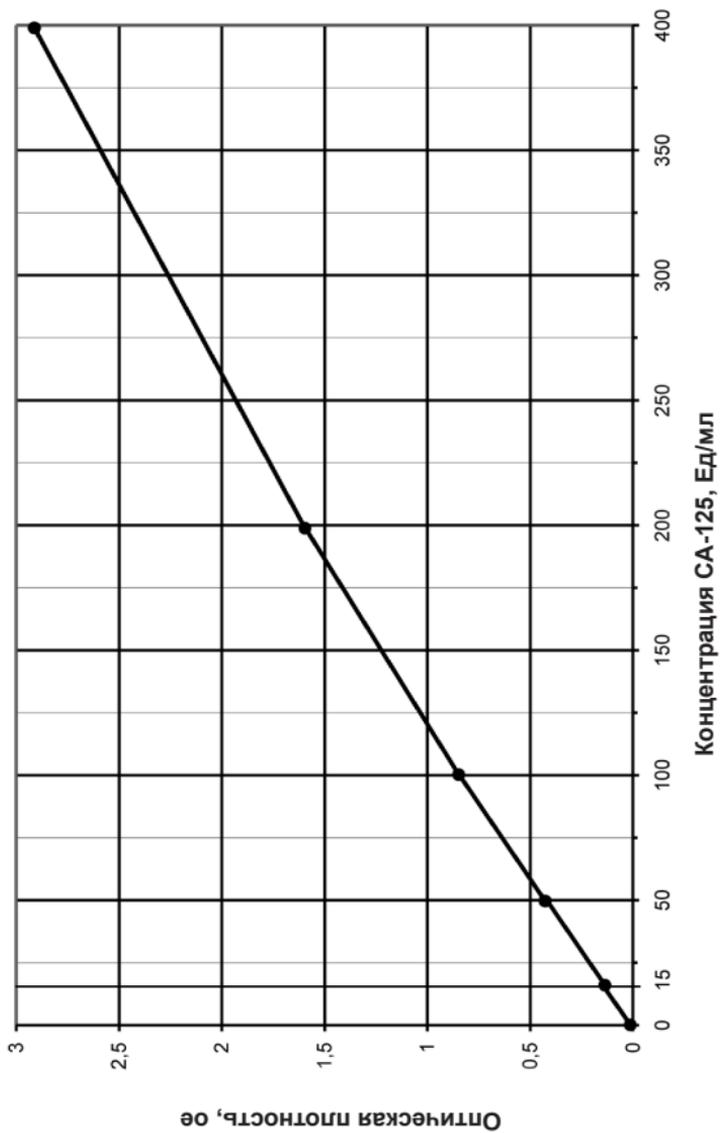


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации СА-125 в калибровочных пробах.

**11.6.** При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации СА-125 в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

## **12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА**

**12.1.** Набор реагентов «СА-125 – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

**12.2. Дробное использование набора** может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации СА-125 в контрольном образце.

**12.3.** При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

*Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.*

**12.4.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества набора**  
обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:  
630559, Новосибирская обл.,  
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,  
тел. /факс (383) 336-73-46,  
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

**За справками и консультацией обращаться:**  
в лабораторию ИФА гормонов и опухолевых маркеров,  
тел. (383) 227-75-41

14.10.10.



**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086  
на производство, хранение и реализацию  
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ  
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ  
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D  
Инфекции, передаваемые  
половым путем  
ВИЧ-инфекция  
TORCH-инфекции  
Клещевой энцефалит  
Паразитарные болезни  
Диагностика беременности  
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество  
и точный результат  
для Вашей лаборатории!***

**Наш адрес:** 630117, Новосибирск-117, а/я 492  
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)  
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,  
332-67-49, 332-67-52  
*E-mail:* [vbmarket@vector-best.ru](mailto:vbmarket@vector-best.ru)  
Internet: [www.vector-best.ru](http://www.vector-best.ru)