



## Набор ИФА для определения онкомаркера TM-CA 125

Каталог. № : EIA-5072  
Количество : 96  
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2011  
Версия 2.0

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

### 1. ВВЕДЕНИЕ

#### 1.1 Предназначение

Набор ИФА DRG TM-CA 125 является иммуноанализом для количественного определения *in vitro* онкомаркера CA 125 в сыворотке и плазме крови человека.

#### 1.2 Краткое описание и объяснение

В качестве онкомаркера 125 в сыворотке крови выступают антигенные детерминанты гетерогенного высокомолекулярного (200 – 1000 кД) гликопротеина. При опухолях яичников высокие концентрации этого гликопротеина обычно регистрируют в сыворотке крови и немущиозном эпителии.

Значения CA 125 повышены у большинства пациентов с эпителиальным раком яичников, включая тех, у кого первая стадия заболевания.

У женщин с первичной эпителиальной карциномой яичников, которые перенесли основную терапию с последующей диагностикой, значение CA 125, больше или равное 35 Е/мл, указывает на присутствия остаточной опухоли. Тем не менее, низкий уровень содержания этого онкомаркера еще не гарантирует полного отсутствия раковых клеток у пациента.

Рекомендуется, чтобы набор ИФА DRG TM-CA 125 использовался квалифицированным доктором в области гинекологических видов рака, или за его направлением.

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG TM-CA 125 ELISA Kit представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на сэндвич-принципе.

Микротитровальные лунки покрыты моноклональными [мышиними] антителами, направленными на специальную антигенную зону молекулы CA 125.

Аликвот образца пациента, содержащий эндогенный CA 125, инкубируется в лунке, покрытой ферментным конъюгатом, который является анти-CA 125 антителом, конъюгированным пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат вымывается. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации CA 125 в образце.

При добавлении раствора субстрата, интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна концентрации CA 125 в образце пациента.

### 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты протестированы на ВИЧ и гепатит В и признаны безопасными. Однако весь материал стоит расценивать как потенциально заразный.
- Избегать контакта со стоп-раствором (0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Можно получить раздражение кожи или ожог.
- Не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей или слизистыми.
- Не курить, не есть, не пить, не наносить косметику вблизи реагентов.
- Надевать одноразовые латексные перчатки при контакте с реагентами. Микробная контаминация может дать ложные результаты.
- Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивать реагенты между собой и не использовать реагенты из других наборов.

### 4. РЕАГЕНТЫ

#### 4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитрационные лунки**, 12x8 (делимых) стрипов, 96 лунок, покрытых анти-CA 125 антителом (моноклональным).
2. **Нулевой стандарт**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию. Содержит нертутный консервант.
3. **Стандарт (1-5)**, 5 флаконов, 0,5 мл каждый, готовы к использованию. Концентрации: 25, 75, 150, 300, 600 Е/мл, Содержит нертутный консервант.
4. **Контроль низкий и высокий**, 2 флакона по 0,5 мл в лиофилизированном виде, см. «Подготовка реагентов». Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетке флакона или в листе контроля качества.
5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 7 мл, готов к использованию. Анти-CA125 антитело, конъюгированное пероксидазой хрена. Содержит нертутный консервант.
6. **Субстратный раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию тетраметилбензидин (ТМБ).
7. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Содержит 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
8. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл (40х концентрированный). См. «Подготовка реагентов».

**Внимание:** Дополнительный *Нулевой Стандарт* для разбавления образцов доступен по запросу.

#### 4.2 Требуемые материалы, не поставляемые в наборе

- Микропланшетный откалиброванный ридер (450 ± 10 нм).
- Калиброванные микропипетки переменной точности.
- Гигроскопичная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Полулогарифмическая миллиметровка или ПО для обработки данных.

#### 4.3 Условия хранения

При условии хранения 2 – 8 °С не вскрытые реагенты сохраняют реактивность до истечения срока годности. Не используйте реагенты после этой даты.

Открытые реагенты должны храниться при 2 – 8 °С. Микролунки должны храниться 2 – 8 °С. Как только мешок фольги был открыт, необходимо снова его прочно закрыть. Открытые наборы сохраняют активность в течение двух месяцев при условиях, описанных выше.

#### 4.4 Подготовка реагентов

Перед использованием доведите все реагенты и требуемое количество стрипов до комнатной температуры.

#### Промывочный раствор

Добавьте деионизированную воду к 40х концентрату промывочного раствора.

Разбавьте 30 мл концентрированного *Промывочного раствора* дистиллированной водой на 1170 мл до заключительного объема 1200 мл.

*Разбавленный Промывочный раствор стабилен в течение 2 недель при комнатной температуре.*

#### 4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна быть проведена согласно местному законодательству. Специальная информация для этого продукта дана в Сертификате Безопасности.

#### 4.6 Поврежденные наборы

В случае любого тяжелого повреждения набора или компонентов, нужно сообщить об этом в ДРГ в письменной форме не позднее, чем спустя одну неделю после получения набора. Сильно поврежденные компоненты не должны использоваться в тесте. Они должны быть сохранены, пока не будет найдено окончательное решение. После этого они должны быть утилизированы согласно официальным инструкциям.

### 5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном анализе могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТА- или гепарин-плазма).

Не используйте гемолизные, желтушные или жирные образцы. Пожалуйста, обратите внимание: Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в данном тесте.

## 5.1 Сбор образцов

### Сыворотка:

Соберите кровь венипункцией (например, Саршtedт Моноветт # 02.1388.001), позвольте ей стечь и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания. Образцы пациентов, получающих терапию противосвертывающего средства, могут потребовать большего времени свертывания крови.

### Плазма:

Целая кровь должна быть собрана в пробирки для центрифуги, содержащие антикоагулянт, и центрифугироваться немедленно после отбора.

(Например, для ЭДТА-плазмы Саршtedт Моноветт – красный колпачок - # 02.166.001; для Гепарина-плазмы Саршtedт Моноветт – оранжевый колпачок - # 02.165.001;

## 5.2 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрыты и могут храниться до анализа в течение 5 дней при 2 – 8 °С.

Если ЭДТА-плазма хранится при 2 – 8 °С, она должна быть протестирована в течение 48 часов.

Образцы, не востребованные в течение более длительного времени (до двух месяцев), должны быть заморожены только один раз при -20 °С до теста. Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз до тестирования.

## 5.3 Разбавление образцов

Если при первом тесте образец содержит аналита больше, чем самый высокий стандарт, его можно разбавить *Нулевым Стандартом* и повторно проанализировать, как описано в Процедуру анализа.

Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

### Пример:

а) разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (смешиваются полностью),

б) разбавление 1:100: 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (смешиваются полностью).

## 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

### 6.1 Общие Замечания

- Всем реактивам и анализам нужно позволить дойти до комнатной температуры перед использованием. Все реагенты должны быть смешаны без вспенивания.
- Как только тест был начат, все шаги должны быть закончены без прерывания.
- Используйте новые одноразовые наконечники пипеток для каждого стандарта, контроля или образца, чтобы избежать контаминации.
- Абсорбция - функция времени инкубации и температуры. Прежде, чем начать тест, рекомендуется, чтобы все реагенты были готовы, удаленные колпачки, все необходимые лунки закреплены в держателе, и т.д. Это обеспечит равное затраченное время для каждого шага раскапывания без прерывания.
- Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

### 6.2 Процедура анализа

– Каждая постановка должна включать в себя стандартную кривую.

1. Закрепить желаемое количество лунок в рамке-держателя.
2. Внести по **50 мкл стандартов, образцов, контролей** в соответствующие лунки.
3. Внести по **50 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку. Аккуратно перемешивать 10 секунд. Важно добиться полного смешивания на этом этапе.
4. Инкубировать при комнатной температуре **60 минут**.
5. Удалить инкубационную смесь в контейнер для отходов. Промыть лунки 3 раза разведенным раствором для промывки (300 мкл на лунку). Постучать панелью по абсорбирующей бумаге, чтобы удалить оставшиеся капли.  
**Важно:** Чувствительность и точность данного теста сильно зависят от правильной процедуры промывки!
6. Внести по **100 мкл субстратного раствора** в каждую лунку.
7. Инкубировать при комнатной температуре **15 минут**.
8. Остановить реакцию, добавив по **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку.

9. Определите абсорбцию (ОП) каждой лунки при **450 ± 10 нм** микропланшетным ридером. Рекомендуется, чтобы лунки были считаны в течение **10 минут** после добавления стоп-раствора.

### 6.3. Вычисление результатов

1. Вычислите средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.
2. Ручной метод: используя полулогарифмическую миллиметровку, создайте стандартную кривую, изображая среднюю абсорбцию, полученную из каждого стандарта против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрации на горизонтали (X) оси.
3. Используя среднее значение абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию от стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты, показанные в данной инструкции, были вычислены автоматически с использованием 4 ПЛ (4-параметровой логистики) кривой. 4-параметровая логистика является предпочтительным методом. Другие функции обработки данных могут дать немного различные результаты.
5. Концентрация образцов может читаться непосредственно по этой стандартной кривой. Образцы с концентрациями выше, чем у самого высокого стандарта, должны быть разбавлены и проанализированы заново либо представлены как > 600 Е/мл. Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

#### 6.3.1 Пример типичной калибровочной кривой

Следующие данные предназначены только для демонстрации и **не могут** использоваться для реального анализа.

Стандарт	Оптические величины (450 нм)
Стандарт 0 (0 Е/мл)	0,02
Стандарт 1 (25 Е/мл)	0,16
Стандарт 2 (75 Е/мл)	0,41
Стандарт 3 (150 Е/мл)	0,75
Стандарт 4 (300 Е/мл)	1,27
Стандарт 5 (600 Е/мл)	1,76

### 7. Ожидаемые значения нормы

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные уровни и отклоняющиеся от нормы величины. В наших исследованиях при тестировании здоровых пациентов взрослого возраста методом ИФА с использованием набора реагентов **DRG TM-CA 125** были получены следующие данные:

Популяция	Количество	Конц. (Е/мл)	Медиана (Е/мл)	5% процентиль (Е/мл)	95% процентиль (Е/мл)
Мужчины	35	6,47	8,90	2,53	18,80
Женщины	35	3,51	5,30	1,67	13,09

Согласно данным клинических исследований при тестировании антигена рака яичников пороговое значение (cut-off) необходимо устанавливать в диапазоне от 35-65 Е/мл (8-9).

Полученные результаты ИФА следует обязательно сопоставлять с данными других диагностических методов, т.к. сами по себе они не могут служить достаточным основанием для назначения протестированным пациентам тех или иных терапевтических процедур.

### 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартные правила лабораторной практики требуют, чтобы контроль использовался при каждой калибровочной кривой. Статистически значительное количество контролей должно быть измерено, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, гарантирующие точную работу.

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственному регулированию и нормам федерального права. Использованию контрольных образцов рекомендуется использовать повседневно для проверки подлинности результатов. Используйте контроли на нормальных и на патологических уровнях. Контрольные значения и соответствующие результаты лаборатории ОТК заявлены в листе контроля качества (КК), вложенном в набор. Значения и диапазоны, обозначенные в листе КК, относятся всегда только к текущей партии (лоту) набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные или международные программы Оценки Качества, чтобы гарантировать точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для того, чтобы проанализировать значения контроля и тренды. Если результаты анализа не вписываются в указанные диапазоны контроля, результаты пациента должны считаться неверными. В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические аспекты: раскапывание из пипетки и измерительные устройства; фотометр, сроки годности реактивов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывки. После проверки вышеупомянутых параметров, не находя ошибки, пожалуйста, свяжитесь с Вашим дистрибьютором или ДРГ непосредственно.

## 9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа в пределах между 0,25 – 600 Е/мл.

### 9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Каких-либо перекрестных реакций с СА 19-9, СЕА, СА 72-4 и другими анализитами не было обнаружено.

### 9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность ДРГ ИФА была вычислена, добавляем 2 среднеквадратичных отклонения к среднему значению анализа 20 репликатов нулевого стандарта, и составила 0,25 Е/мл.

### 9.4 Воспроизводимость

#### 9.4.1 В анализе

Вариабельность в анализе указана ниже:

Образец	Кол-во	Среднее (Е/мл)	КВ (%)
1	20	16,9	5,9
2	20	26,7	5,8
3	20	135,8	4,5

#### 9.4.2 Между анализами

Вариабельность между анализами указана ниже:

Образец	Кол-во	Среднее (Е/мл)	КВ (%)
1	40	19,5	13,8
2	40	33,8	10,6
3	40	82,7	6,5

### 9.5 Восстановление

Образцы были насыщены добавлением растворов СА 125 с известными концентрациями в соотношении 1:1. Процент восстановления был вычислен умножением отношения измерений и ожидаемых значений на 100 (ожидаемое значение = эндогенный СА 125 + добавленный СА 125) / 2; из-за разбавления 1:2 сыворотки с насыщающим материалом).

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Е/мл]	19,0	97,1	191,1
Средний процент восстановления	89,4	94,4	94,9
Степень восстановления [%]	от	89,1	91,4
	до	89,7	99,8

### 9.6 Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Е/мл]	17,7	29,5	103,0
Средний процент восстановления	106,9	101,7	90,6
Степень восстановления [%]	от	95,8	90,7
	до	113,3	108,6

## 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены только тогда, когда процедура анализа будет выполнена с полным пониманием инструкции, вложенной в набор, а также когда будет привязка к стандарту НЛП.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого теста могут повлиять на результаты.

### 10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не имеет никакого влияния на результаты анализа. Проба содержит реагенты для минимизации вмешательства АМАЧ (антимышиных антител человека) и гетерофильных антитела. Однако, чрезвычайно высокие титры АМАЧ или гетерофильных антител могут повлиять на результаты теста.

### 10.2 Влияние лекарственных средств

До сих пор нам не известны никакие вещества (препараты), которые имеют влияние на измерение СА 125 в образце.

### 10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

«Хук-эффект» не наблюдался в этом исследовании до 19 200 Е/мл СА 125.

## 11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

### 11.1 Надежность результатов

Тест должен быть выполнен полностью согласно инструкциям изготовителя для использования. Кроме того пользователь должен строго следовать правилам GLP (Надлежащая Лабораторная Практика) или другим доступным национальным стандартам и/или законам. Это особенно важно для использования контрольных реактивов. Важно всегда включать в рамках теста достаточное число контрольной для того, чтобы удостовериться в правильности и точности теста.

Результаты испытаний действительны, только если все контрольные в пределах указанных диапазонов и если все другие параметры теста также в пределах данных спецификаций анализа. В случае любого сомнения или беспокойства, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

### 11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические выводы никогда не должны быть основаны на одних только лабораторных результатах, даже если все результаты испытаний совпадают с вещами, указанными в п. 11.1. Любой лабораторный результат - только часть полной клинической картины пациента.

Только в случаях, когда лабораторные результаты находятся в приемлемом совпадении с полной клинической картиной пациента, делаются терапевтические выводы.

Сам результат испытаний никогда не должен быть единственным определяющим фактором для того, чтобы получить любые терапевтические выводы.

### 11.3 Ответственность

Любая модификация набора и/или замена, или смешивание любых компонентов различных партий от одного набора с другим могут отрицательно повлиять на результаты и валидацию всего теста. Такая модификация и/или замена лишают законной силы любое рекламационное требование.

Рекламационные требования, попадающие под неверное истолкования клиентом лабораторных результатов, указанных в п. 11.2., также не принимаются. Тем не менее, в случае любого требования, ответственность изготовителя не должна превышать стоимость набора. Любой ущерб, нанесенный набору во время транспортировки, не относится к ответственности изготовителя.

## 12. ССЫЛКИ / ЛИТЕРАТУРА

(см. в оригинале инструкции)

### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)