



**Набор ИФА**  
**для количественного определения в**  
**сыворотке человека**  
**РАКОВОГО АНТИГЕНА ЯИЧНИКА CA-12-5**

**Кат. №** : 6502Z  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DAI (США)

*Методика от 07-10-2009*

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

<b>Анализ</b>	<b>CA-12-5 ELISA</b>
<b>Метод</b>	<b>Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов</b>
<b>Принцип</b>	<b>Конъюгированный пероксидазой ИФА</b>
<b>Диапазон обнаружения</b>	<b>0-400 Е/мл</b>
<b>Образец</b>	<b>100 мкл сыворотки</b>
<b>Специфичность</b>	<b>97 %</b>
<b>Чувствительность</b>	<b>5 Е/мл</b>
<b>Общее время</b>	<b>~ 200 мин. (3,5 часа)</b>
<b>Срок годности</b>	<b>12-14 мес.</b>

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Данный набор в первоначально предназначен для мониторинга и проверки. Патологические результаты (например, повышенный уровень СА-125 в сыворотке) могут указывать на рак яичников и требует дальнейшего клинического вмешательства. Анализ сыворотки на СА-125 является опухолевым маркером для пациентов при клинической ремиссии, последующей за лечением. Послеоперационные значения СА-125 в сыворотке вне нормы, указывают на наличие остатков опухоли. Опухолевый рецидив часто сопровождается увеличением СА-125 в сыворотке до того, как прогрессирующая болезнь станет клинически очевидной.

**ВВЕДЕНИЕ**

Одна из 70 американских женщин болеет раком яичников. Приблизительно 20000 новых диагнозов рака яичников ставится каждый год и более чем 12 000 женщин умирает. Рак яичников наиболее распространенный тип гинекологических опухолей, с коэффициентом выживания 30%. Это обусловлено тем, что часто диагноз ставится уже на прогрессирующей стадии. Раковый антиген СА 12 это поверхностный антиген, ассоциированный с эпителиальным раком яичником. В сыворотке СА 125 ассоциируется с гликопротеином с высоким молекулярным весом. Концентрация этого ракового маркера в сыворотке может определяться и измеряться муриновым моноклональным антителом. Напечатанные исследования показали, что повышенный уровень СА 125 обнаружен также в индивидов при аденокарциноме фаллопиевых труб, при злокачественных не гинекологических опухолях и некоторых условиях, не повязанных со злокачественными опухолями.

Концентрация СА 125 в сыворотке выше, чем 35 единиц на мл в приблизительно около 60 % женщин с раком яичников. У более чем, 80 % пациентов с распространенным раком яичников концентрация СА 125 выше, чем 35 единиц на мл. Уровень СА 125 повышенный в 1% нормальных здоровых женщин, у 3% нормальных здоровых женщин с легкими заболеваниями яичников, у 6% при условиях, не повязанных с опухолью (включая первый триместр беременности, менструация, эндомитоз, фиброз матки, Стрый сальпингит, заболевания печени и воспалением брюшины, перикарды и плевры). Уровень СА 125 в сыворотке выше, чем 35 единиц на мл вместе с тазовой оценкой увеличивает специфичность теста. Последовательное определение СА 125 в сыворотке потом усиливает положительное показание теста при опухоли яичников. Концентрация СА 125 может использоваться при мониторинге пациентов с раком яичников. Высокое значение СА 125 может ассоциироваться с прогрессирующей злокачественной болезнью и плохим ответом на терапию. С другой стороны, уменьшение СА 125 дает хорошие прогнозы и указывает на соответствующий ответ на лечение. Оставшаяся болезнь подтверждена в 95% случаев при

концентрации СА 125 в сыворотке выше, чем 35 единиц на мл, однако отрицательный результат не исключает наличие болезни. К сведению, СА 125 наиболее чувствительный маркер оставшийся эпителиальной опухоли яичников. СА 125 также может увеличиваться в пациентов с опухолью легких, цервикальной опухоли, опухоли матки и матковых труб, а также фаллопиевых труб.

**ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Набор количественного анализа СА-125 основывается на твердофазовом иммуоферментным анализом. В нем используется одно моноклональное анти-СА-125 антитело для иммобилизации твердой фазы (микропланшетные лунки) и другое моноклональное анти-СА 125 антитело в растворе конъюгата антитела-фермента (пероксидазы хрена). Стандарты и образцы теста добавляются в микропланшетные титровальные лунки, покрытые антителом СА-125. Потом добавляется антитело СА-125 меченное пероксидазой хрена (конъюгатом). Если СА-125 присутствует в образце, оно связывается с антителом в лунке и ферментным конъюгатом, в результате чего молекулы СА-125 расслаиваются между твердой фазой и ферментно-связанными антителами. После 3 часовой инкубации при 37<sup>0</sup>С, лунки промываются водой для удаления несвязанных меченных антител. Добавляется раствор ТМБ и инкубируется 20 минут, в результате чего развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением 2N HCl. Цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация СА-125 прямо пропорциональна интенсивности цвета в анализируемом образце.

**МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ**

**Материалы, входящие в состав набора:**

- Микротитровальный планшет с лунками, покрытыми моноклональными анти-СА-12-5 антителами, 96 лунок.
- Реагент ферментного конъюгата , 12 мл.
- Набор референтных стандартов СА-125, содержащий: 0; 15, 50, 100, 200 и 400 Е/мл СА-12-5, жидкие, готовые к использованию.
- ТМБ субстрат, 12 мл.
- Стоп-раствор, 12 мл.
- Концентрат промывочного буфера (50x), 15 мл.

**Материалы, не входящие в состав поставки:**

- Точные пипетки и наконечники: 0,04- 0,2 мл.
- Одноразовые наконечники.
- Дистиллированная вода.
- Вихревой смеситель.
- Промокающая бумага или бумажное полотенце.
- Микротитровальный планшетный считыватель.
- Миллиметровочная бумага.

**СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

1. Кровь необходимо собирать, используя стандартную технику венопункции и как можно быстрее сыворотку необходимо отделить от красных кровяных клеток. Избегайте сильно гемолизированных, липемических и мутных образцов.
2. Образцы плазмы, собранные в пробирки, содержащие EDTA, гепарин или оксалат могут влиять на процедуру, поэтому их не следует использовать.
3. Образцы должны храниться закрытыми до 48 часов при 2-8<sup>0</sup>С до начала тестирования. Для более длительного хранения они должны быть заморожены до -20<sup>0</sup>С. Размороженные образцы необходимо перемешать.

**ХРАНЕНИЕ НАБОРОВ и ИНСТРУМЕНТАРИЯ**

1. Невскрытые наборы следует хранить при 2-8<sup>0</sup>С, а микротитровальный планшет – в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Тестовый набор может использоваться до окончания срока пригодности (один год после даты изготовления). Смотрите дату пригодности, указанную на этикетке.
2. Вскрытый набор остается стабильным до окончания срока пригодности при хранении как указано выше.
3. Микропланшет с шириной дорожки 10 мм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм используется для измерения абсорбции.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

1. Перед использованием доведите реагенты до комнатной температуры (18-25<sup>0</sup>С) и смешайте легким переворачиванием или вращением. ИЗБЕГАЙТЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕНЫ.
2. Разбавьте 1 объем промывочного буфера (50x) 49 объемами дистиллированной воды. Например, разбавьте 15 мл промывочного буфера (50x) в дистиллированной воде чтобы

приготовить 750 мл просывочного буфера (1х). Перед использованием хорошо перемешайте.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите нужное количество лунок в рамку для полосок. Внесите по **100 мкл** стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки. Тщательно, но осторожно перемешайте 10 секунд.
2. Внесите по **100 мкл** реагента ферментного конъюгата в каждую лунку. Тщательно перемешайте в течении 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания на этом этапе. Инкубируйте при 37°C 3 часа.
3. Удалите содержимое лунок. Промойте и опустошите планшет 5 раз промывочным буфером(1х). Резко встряхните планшет на промокательную бумагу, чтобы удалить все остатки капель воды.
4. Внесите 100 мкл реагента ТМБ субстрата в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 10 секунд. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течении 20 минут.
5. Остановите реакцию внесением **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку. Аккуратно перемешайте на протяжении 10 секунд. Удостоверьтесь в полном изменении синей окраски на желтую.
6. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм в течении 15 минут.

#### Важное замечание:

1. Процедура промывания крайне важна. Недостаточное промывание приведет к низкой точности и ошибочно повышенной абсорбции при считываниях.
2. Рекомендуется использовать не более 32 лунок при ручном пипетировании, поскольку, пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно занимать 5 минут. Использование полного планшета на 96 лунок возможно при автоматическом пипетировании.
3. Дублирование всех стандартов и образцов не обязательно, но рекомендуется.

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определите среднюю абсорбцию для каждого набора стандартов, контролей и образцов. На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную от каждого референтного стандарта против его концентрации м Е/мл со значениями абсорбции на вертикальной или оси Y и концентрациями на горизонтальной или оси X. Используйте средние значения абсорбции для каждого образца, чтобы определить из калибровочной кривой соответствующее значение концентрации СА 125 в Е/мл. Любые разбавленные образцы должны быть скорректированы соответствующим коэффициентом разбавления.

#### ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной калибровочной процедуры со считыванием ОП при 450 нм указаны на оси Y против концентраций СА-125 на оси X.

Значения СА-125 (Е/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,010
15	0,105
50	0,347
100	0,703
200	1,411
400	2,437

Эта калибровочная кривая используется только в целью иллюстрации, и не должна использоваться для вычисления неизвестных значений. Каждый пользователь должен получить свою калибровочную кривую и данные.

(Пример калибровочной кривой см. в оригинале инструкции).

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Значения СА-125 у здоровых женщин ниже 35 Е/мл. Минимально определяемая концентрация СА-12-5 установлена на уровне 5 Е/мл.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежные и соответствующие результаты будут получены при проведении анализа в соответствии с инструкцией и хорошей лабораторной практикой.
2. Процедура промывания крайне важна. Недостаточное промывание приведет к низкой точности и ошибочно повышенной абсорбции при считываниях.
3. Образцы пациентов могут содержать человеческие анти-мышинные антитела (НАМА), что могут влиять на результаты. Данный набор разработан для минимизирования такого рода влияния. Но, полного исключения этого влияния невозможно

гарантировать. Результаты анализа, которые не соответствуют клинической картине или истории болезни пациента должны интерпретироваться с осторожностью.

#### 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)