



**Инструкция
пользователя**



ТМ-СА 125 ИФА

REF EIA-5072

Σ 96 лунок

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 ВВЕДЕНИЕ**1.1 Наименование и назначение**

DRG TM-CA 125 ИФА - набор для количественного определения онкомаркера СА 125 в сыворотке и плазме крови человека.

1.2 Описание и объяснение теста

TM-CA 125 ИФА тест для обнаружение антигенных детерминант гетерогенного высокомолекулярного (200 – 1000 кД) гликопротеина в сыворотке человека. Этот гликопротеин был обнаружен с помощью моноклональных антител Бастом и соавт. (1). Эти гетерогенные детерминанты обнаруживаются в высоком концентрации при немущинозном эпителиальном раке яичников и в сыворотке женщин перенесших подобное заболевание.

Значения СА 125 повышены у большинства пациентов с эпителиальным раком яичников, включая тех, у кого первая стадия заболевания. Повышенные значения также обнаруживаются у 1-2% здоровых людей и могут быть вызваны отличными от рака яичников новообразованиями, включая доброкачественные и злокачественные.

У женщин с первичной эпителиальной карциномой яичников, которые перенесли основную терапию с последующей диагностикой, значение СА 125, больше или равное 35 Ед/мл, указывает на присутствия остаточной опухоли. Уровень СА 125 выше 12 Ед/мл в конце первичной терапии является независимым показателем общей выживаемости и прогрессирования опухоли (PFS) (5,6,7). Тем не менее, уровень содержания этого онкомаркера ниже 35 Ед/мл еще не гарантирует полного отсутствия раковых клеток у пациента, т.к. пациенты с гистопатологическим подтверждением рака яичником могут иметь значения СА 125 в диапазоне здоровых людей.

Рекомендуется использование DRG TM-CA 125 ИФА интерпретировался врачами имеющими опыт в диагностике гинекологических видов рака.

2 ПРИНЦИП ТЕСТА

ДРГ TM-CA 125 - твердофазный иммуноферментный анализ основанный на принципе сэндвича.

Микротитровальные лунки покрыты моноклональными(мышинными) анителями к уникальному антигенному сайту на молекуле СА 125. Образец пациента содержащий эндогенный СА 125 инкубируется в покрытых антителами лунках с кинъюгатом, который представляет собой анти-СА 125 антитела меченые пероксидазой хрена. После инкубации не связавшиеся компоненты вымываются. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации СА 125 в образце. После добавление раствора субстрата, интенсивность окрашивания возрастает пропорционально концентрации СА 125 в образце пациента.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования.
2. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако, не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
3. Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
4. Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
6. Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для

раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно в флаконы, т.к. это может привести к контаминации реагентов.

7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
12. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
16. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
17. Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCL .Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, Вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты, входящие в набор

1. **Микротитровальный планшет** 12 x 8 (делимые) стрипов, 96 лунок;
Лунки покрыты анти-СА 125 антителами (моноклональными).
2. **Нулевой стандарт**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию;
Содержит безртутный консервант.
3. **Стандарты (1-5)**, 5 флаконов, 0,5 мл каждый, готовы к использованию;
Концентрации: 25 – 75 – 150 – 300 - 600 Ед/мл.
Содержат безртутные консерванты.
4. **Высокий и Низкий Контроли**, 2 флакона, 0,5 мл. каждый, готовы к использованию;
Для контрольных значений и диапазонов, пожалуйста, проверьте листок Контроля Качества
5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 7 мл, готов к использованию,
Анти-СА 125 антитела (моноклональные) конъюгированные с пероксидазой хрена.
Содержит безртутные консерванты.
6. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию,
тетраметилбензидин (ТМБ).
7. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию,
содержит 0.5 M H₂SO₄,
Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать раздражение кожи и ожоги.
8. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрат),
см. „Приготовление реагентов“.

Note: Дополнительный Нулевой Стандарт для разведения образцов доступен по запросу.

4.2 Дополнительные материалы и приборы:

- Микротитровальный ридер (450 ± 10 нм) (напр. Микротитровальный ридер DRG Instruments).
- Калибровочные микропипетки различного объема.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Таймер
- Бумага для построения кал.кривой или программное обеспечение для обработки данных

4.3 Хранение и стабильность реагентов

При хранении при $2^{\circ} \div 8^{\circ}\text{C}$ невскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Открытые реагенты хранить при $2^{\circ} \div 8^{\circ}\text{C}$. Микротитровальные лунки хранить при $2^{\circ} \div 8^{\circ}\text{C}$. После использования части лунок необходимо хранить оставшиеся лунки в герметично закрытой упаковке. Иммунореактивность лунок сохраняется припл. 8 недель в плотно закрытой упаковке с влагопоглотителем.

4.4 Приготовление реагентов

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

Рабочий промывочный раствор

Добавьте деионизированную воду к 40х концентрату Промывочного раствора.

Смешайте 1170 мл дистиллированной воды и 30 мл концентрата промывочного раствора до конечного объема - 1200 мл.

Разведенный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности.

4.6 Повреждение Набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, ДРГ должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

5 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ проводится на образцах сыворотки или плазмы (ЭДТА, Гепарин, Цитрат).

Не использовать сильно гемолизованные, гиперлипидные и мутные образцы.

Обратите внимание: образцы содержащие азид натрия не могут использоваться с этим набором.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венопункцией, дайте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

Плазма:

Соберите цельную кровь в центрифужные пробирки содержащие антикоагулянт и немедленно отцентрифугируйте.

5.2 Хранение и Подготовка образцов

Образцы могут хранить до 2 дней при $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

Образцы должны храниться при -20°C (до 12 месяцев), если они не исследуются сразу. Избегайте повторного замораживания / размораживания.

5.3 Разведение образцов

Если во время начального анализа обнаружили, что концентрация образца выше самого высокого стандарта, образец необходимо развести Нулевым Стандартом, и исследован повторно согласно процедуре Анализа.

Для расчета концентрации необходимо учитывать фактор разведения.

Например:

А) разведение 1:10 10 мкл сыворотки + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешайте)

Б) разведение 1:100 10 мкл. Разведенной сыворотки А) 1:10 + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешайте)

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры. Все реагенты должны быть смешаны без образования пены
- После начала процедуры, все шаги должны быть проведены без остановки.
- Используйте новые пластиковые насадки для дозатора для каждого стандарта, контроля и образца для предотвращения контаминации
- Поглощение это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять все крышки и закрепить необходимое количество стрипов в держателе. Это позволит придерживаться одинакового времени между пипетированием.
- Как обычно ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

1. Закрепите необходимое количество стрипов в рамке.
2. Раскапайте **50 мкл** каждого **Стандарта, Контроля и образцов** новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
3. Раскапайте **50 мкл конъюгата** в каждую лунку. Резко перемешивайте в течение 10 сек. Важно на данном этапе добиться полного перемешивания.
4. Инкубируйте при комнатной температуре **1 час**.
5. Быстро вытряхните содержимое лунок.
Промойте **3 раза** разведенным Промывочным Буфером (300 мкл на каждую лунку) и выстучите оставшуюся жидкость на абсорбирующую бумагу.

Важное замечание:

Чувствительность и точность этого анализа напрямую зависят от правильной процедуры промывки!

6. Добавьте **100 мкл Раствора Субстрата**.
7. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **100 мкл Стоп-раствора**.
9. Измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки при 450 ± 10 нм.
Рекомендуется проводить измерение в течение 10 мин. после внесения Стоп-раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Рассчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Построить стандартную кривую: отложить значения абсорбции каждого стандарта напротив их концентраций, абсорбции - на оси Y, концентрации - на оси X.
3. Используя среднее значение абсорбции образцов пациентов определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты данной инструкции были посчитаны с использованием подгонки кривой по 4-параметрической логистической функции (4 PL). Предпочтительные методы:
4 -Parameter Rodbard или 4 Parameter Marquardt. Другие методы обработки данных могут дать отличный (от данного) результат.
5. Концентрации образцов можно считать прямо с данной стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем максимальный стандарт, необходимо разбавить или обозначить концентрацию как > 600 Ед/мл. При подсчете результатов необходимо учитывать кратность разведения.

6.3.1 Пример стандартной кривой

Следующие данные приведены только для демонстрации и не могут использоваться для получения результатов во время анализа.

Стандарт (Ед/мл)	ОП (450 нм)
Стандарт 0 (0.0)	0,02
Стандарт 1 (25)	0,16
Стандарт 2 (75)	0,41
Стандарт 3 (150)	0,75
Стандарт 4 (300)	1,27
Стандарт 5 (600)	1,76

7 ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Строго рекомендовано каждой лаборатории определить свои нормальные и патологические значения.

В наших исследованиях при тестировании здоровых пациентов взрослого возраста методом ИФА с использованием набора реагентов **DRG TM-CA 125** были получены следующие данные:

Население	Число испытуемых	Конц-ия (Ед/мл)	Медиана (Ед/мл)	5% процентиль (Ед/мл)	95% процентиль (Ед/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 cut-off необходимо устанавливать в диапазоне от 35-65 Ед / 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

Лабораторная практика требует, чтобы контроль должен быть проанализирован с каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализированы, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории.

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли с нормальными и патологическими уровнями.

Контроли и соответствующие им результаты полученные Лабораторией Контроля Качества указаны в Паспорте Качества приложенном к набору. Значения и диапазоны указанные на листе КК всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов. Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы пормывки. После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Рабочий диапазон

Рабочий диапазон для данного анализа составляет 0,25– 600 Ед/мл

9.2 Специфичность

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

9.3 Чувствительность

Аналитическую чувствительность вычисляли путем прибавления двух стандартных отклонений к средней величине оптической плотности протестированного нулевого стандарта. По результатам оценки 20 проб нулевого стандарта она составила 0.25 Ед/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Интра-Анализ

Внутренняя точность тестирования представлена в нижеприведенной таблице:

Образец	Кол-во	Среднее (Ед/мл)	КВ (%)
1	20	16.9	5.9
2	20	26.7	5.8
3	20	135.8	4.5

9.4.2 Интер-Анализ

Точность тестирования в серии анализов приведена ниже:

Образец	Кол-во	Среднее (Ед/мл)	КВ (%)
1	40	19.5	13.8
2	40	33.8	10.6
3	40	82.7	6.5

9.5 Воспроизведение

Для оценки восстановления в образцы, содержащие СА 125, вносили растворы этого онкомаркера известной концентрации в соотношении 1:1. При расчете ожидаемых концентраций анализата эндогенный и добавленный СА 125 суммировали и делили эту величину пополам для корректировки увеличившегося объема раствора. О восстановлении определяемого анализата судили по процентному соотношению измеренных и ожидаемых концентраций СА 125 (см. нижеприведенную таблицу).

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация [Ед/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 [Ед/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 если процедура осуществляется с полным пониманием приложенной инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики. Любое неправильное обращение с образцами или модификация данного теста могут повлиять на результаты.

10.1 Интреферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты исследования.

Анализ содержит реагенты, чтобы минимизировать вмешательство человеческих анти-мышинных (НАМА) и гетерофильных антител. Однако, высокий титр анти-мышинных (НАМА) или гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

10.2 Влияние медикаментов

На сегодняшний день неизвестны медикаменты, которые имеют влияние на измерение СА 125 в образце.

10.3 Хук-Эффект

Не было отмечено какого-либо негативного воздействия на прохождение иммунохимических реакций в этом тесте при введении высоких концентраций СА-125 вплоть до: 19200 Ед/мл.

11 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение.

Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и / или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно. Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии

с пунктом 11.2. также недействительны.

Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке не подлежит ответственности производителя.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Bast R.C. et al.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* 1981; 68:1331-1337.
2. Duffy M.J.: Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *Eur. J. Intern. Med.* 2007; 18(3):175-184.
3. Ataseven H. et al.: Cancer antigen 125 levels in inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Lab. Anal.* 2009; 23(4): 244-248.
4. Powell J.L. et al.: Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *J. Reprod. Med.* 2005; 50(8): 585-589.
5. Juretzka M.M. et al.: CA125 level as a predictor of progression-free survival and overall survival in ovarian cancer patients with surgically defined disease status prior to the initiation of intraperitoneal consolidation therapy. *Gynecol. Oncol.* 2007; 104(1): 176-180.
6. Micha J.P. et al: Clinical utility of CA-125 for maintenance therapy in the treatment of advanced stage ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2009; 19(2): 239-241.
7. Kang W.D., Choi H.S., Kim S.M.: Value of serum CA125 levels in patients with high-risk, early stage epithelial ovarian cancer. *Gyneco. Oncol.* 2010; 116(1): 57-60.
8. Klug TL, et al.: Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 125) associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 1984; 44(3):1048-53.
9. Kaesemann H. et al.: Monoclonal antibodies in the diagnosis and follow-up of ovarian cancer. CA 125 as a tumor marker. A cooperative study of the Gynecologic Tumor Marker Group (GTMG). *Klin. Wochenschr.* 1986, 64(17):781-5.