



НАБОР ИФА
для количественного определения в
сыворотке и плазме человека
РАКОВОГО АНТИГЕНА CA 125

Кат. № : EIA-3939
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 07-2006

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

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор ИФА DRG CA 125 предоставляет материалы для количественного определения связанного с раком антигена CA 125 в сыворотке и плазме человека.

Набор предназначен только для диагностического использования in vitro.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор является твердофазовым ферментосвязанным иммуносорбентным анализом, основанным на принципе «сэндвича». Микротитровальные лунки покрыты моноклональным антителом, нацеленным на определенную область антигена на молекуле CA 125.

Аликвот образца пациента с эндогенным CA 125 инкубируют в лунке с конъюгатом фермента. Который является анти-CA 125 моноклональным антителом антитело, конъюгированным пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат вымывается. Количество связанного конъюгата пропорционально концентрации CA 125 в образце. При добавлении раствора субстрата интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна концентрации CA 125 в образце пациента.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике in vitro.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2 поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в

различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.

- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (делимых) стрипов, 96 лунок. Лунки покрыты мишиным моноклональным антителом анти-CA125.
 2. **Нулевой стандарт**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию, содержит 0,010% метилизотиазолона, 0,015% антитела бромонитродиксана в качестве консерванта.
 3. **Стандарт (стандарт 1-5)**, 5 флаконов 0,5 мл, готов к использованию. Концентрации: 15, 30, 80, 200, 500 Е/мл. Содержит 0,010% метилизотиазолона, 0,015% бромонитродиксана в качестве консерванта.
 4. **Контроль**, 1 флакон (лиофилизированный), 0,5 мл, Значения контролей и границы узнайте см этикетке. Содержит 0,3% проклина в качестве консерванта.
 5. **Ферментный конъюгат**, 10X концентрат, 0,75 мл. 1 флакон, 0,75 мл, анти-CA 125 антитело (мышиный моноклональный) конъюгированный пероксидазой хрена. Содержит 0,010% метилизотиазолона, 0,010% бромонитродиксана в качестве консерванта.
 6. **Разбавитель конъюгата**, 1 флакон, 7 мл, готов к использованию. Содержит 0,3% проклина в качестве консерванта
 7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию TMB.
 8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, (0,5 M H₂SO₄), 14 мл. Избегать контакта со стоп-раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
 9. **Промывочный раствор**, 40X концентрат, 30 мл. См. «Подготовка реагентов».
- Примечание:** *Дополнительный нулевой стандарт для разбавления образцов доступен по запросу.*

4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшеточный откалиброванный считыватель (450/620nm +/- 10nm).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать.

Все открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть.

4.3 Подготовка реагентов

Довести реагенты до комнатной температуры непосредственно перед использованием.

Контроль

Развести лиофилизат 0,5 мл дистиллированной воды и дать отстояться минимум 10 мин. Помешать контроль несколько раз перед использованием.

Примечание Разведенный контроль необходимо разделить на порции и хранить при -20°C.

Промывочный раствор

Разбавьте 30 мл концентрированного промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды для конечного объема 1200 мл.

Разбавленный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

Ферментный конъюгат

Развести концентрат ферментного конъюгата разбавителем конъюгата 1:10.

Стабильность приготовленного ферментного конъюгата: 1 неделя при 2 – 8°C в герметичной емкости.

Пример: разбавьте 700 мкл ферментного конъюгата 6,3 мл разбавителя конъюгата. Если используется целый планшет, разбавьте 600 мкл ферментного конъюгата 5,40 мл разбавителя конъюгата для достижения конечного объема 6 мл.

Если используется не целый планшет, приготовьте необходимый объем ферментного конъюгата смешиванием 50 мкл ферментного конъюгата 10х концентр. с 0,45 мл разбавителя конъюгата на стрип. (см. таблицу ниже):

Количество стрипов	Ферментный конъюгат 10х конц. (мкл)	Разбавитель конъюгата (мл)
1	50	0,45
2	100	0,90
3	150	1,35
4	200	1,80
5	250	2,25
6	300	2,70
7	350	3,15
8	400	3,60
9	450	4,05
10	500	4,50
11	550	4,95
12	600	5,40

4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной инструкции).

5. ОБРАЗЕЦ

Сыворотка или плазма (гепариновая или ЭДТА) подходят для анализа. Не использовать гемолизированные, иктерические или липемические образцы.

Примечание: Образцы, содержащие азид натрия не должны использоваться в анализе.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Собрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания. Пациентам, проходящим терапию антикоагулянтами, может потребоваться больше времени для свертывания.

Плазма:

Вся кровь должна помещена в контейнеры для центрифугирования вместе с антикоагулянтами сразу после сбора.

5.2 Хранение образцов

Перед анализом образцы должны храниться закрытыми до 5 дней при 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Размороженные образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разбавление

При проведении первого анализа, образец сыворотки содержит значения более чем наивысший стандарт, образцы могут быть разбавлены 10-кратно или 100-кратно *нулевым стандартом* и проанализированы повторно как описано в «Процедуре анализа». Для определения концентрации нужно учесть последующий коэффициент разбавления.

Например:

- разбавление 1:10 — 10 мкл сыворотки + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно смешать);
- разбавление 1:100 — 10 мкл разбавленного а) 1:10 + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно смешать).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы нужно привести к комнатной температуре перед использованием. Их нужно смешать без пенообразования.
- Как только процедура анализа начата, следите за тем, чтобы все шаги проводились без прерывания.
- Используйте новые наконечники для пипеток для каждого стандарта, контроля, или образца для того чтобы избежать перекрестного загрязнения.
- Абсорбция зависит от температуры и времени инкубации. Перед началом анализа рекомендуется приготовить все реагенты, снять крышечки, поместить стрипы в держатель. Это даст возможность минимизировать время между шагами анализа.

- **Общее правило:** ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Каждая процедура должна включать калибровочную кривую.

1. Закрепить желаемое количество лунок в держателе.
 2. Внести по **50 мкл** каждого стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки **новыми одноразовыми наконечниками**.
 3. Внести по **50 мкл** свежеприготовленного разбавленного ферментного конъюгата (см. «Подготовка реагентов») в каждую лунку.
 4. Аккуратно перемешивать 10 секунд. Важно добиться полного смешивания на этом этапе.
 5. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре не накрывая.
 6. Удалить инкубационную смесь в контейнер для отходов. Промыть лунки 3 раза разведенным раствором для промывки (400 мкл на лунку). Постучать планшетом о промокательную бумагу, чтобы удалить оставшиеся капли.
- Примечание:** Чувствительность и точность анализа очень зависит от точного исполнения процедуры промывания.
7. Внести по **100 мкл** реагента ТМВ в каждую лунку.
 8. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре, в темноте.
 9. Остановить реакцию, добавив **100 мкл** стоп-раствора в каждую лунку.
 10. Считать оптическую плотность при **450 +/- 10 нм** в течение **10 минут** после добавления стоп-раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Построить стандартную кривую, поместив средние значения абсорбции, полученные для каждого референс-стандарта против его концентрации в U/ml, с абсорбцией на вертикальной оси (y) и концентрацией на горизонтальной оси (x).
3. Используя средние значения абсорбции для каждого образца, определить соответствующую концентрацию CA 125 в Е/мл по стандартной кривой.
4. Автоматический метод: компьютерные программы, использующие кубическое сглаживание, 4 PL или Logit-Log могут давать хороший результат.
5. Концентрация образцов может быть прочитана прямо из этой стандартной кривой. Образцы с концентрациями выше стандартных должны быть разведены еще. Но при подсчете концентрации фактор разведения должен быть взят в расчет.

Типичный пример стандартной кривой:

Стандарт	нг/мл	Оптич. единицы (450 нм)
Стандарт 0	0	0,06
Стандарт 1	15	0,12
Стандарт 2	30	0,20
Стандарт 3	80	0,38
Стандарт 4	200	0,88
Стандарт 5	500	2,00

7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется определять свои значения нормы и патологии. См. оригинал инструкции.

Процентиль 5-95%

Здоровые люди
(мужчины и женщины): < 29,6 Е/мл

Это соответствует официальному пороговому значению **35 Е/мл**.

8. ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА

8.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится в пределах 0-500 Е/мл.

8.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Сыворотки здоровых пациентов не реагировали в настоящем анализе.

8.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность была определена как среднее + два стандартных отклонения 20 репликатов анализов нулевого стандарта и составила **3,327 Е/мл**.

8.4 Точность**8.4.1 Вариативность в анализе**

Образец	К-во	Среднее (Е/мл)	КВ (%)
1	20	24,99	7,57
2	20	96,70	2,52

8.4.2 Вариативность между анализами

Образец	К-во	Среднее (Е/мл)	КВ (%)
1	12	28,04	8,26
2	12	99,80	7,12
3	12	43,38	8,25

8.5 Точность**8.5.1 Контроль качества**

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно регулированию. Контрольные образцы нужно использовать каждый день для подтверждения результатов. Их используйте на нормальных и паранормальных уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лабораторий контроля качества показаны в сертификате контроля качества, который добавляется к набору. Значения и нормы в сертификате отвечают данному набору и их не нужно использовать для прямого сравнения с результатами теста.

Рекомендуется также использовать национальные и международные программы Контроля Качества для большей точности полученных результатов.

Используйте подходящие статистические методы для анализа контрольных значений и общих направлений. Если результаты анализа не подходят к установленным нормам значений контрольных материалов, результаты пациента нужно считать недействительными. В этом случаи пожалуйста сверьте следующие технические аспекты: Средства для пипетирования и измерения времени, фотометр, даты истечения сроков годности реагентов, условия хранения и инкубирования, методы аспирации и промывания.

После проверки всего выше указанного, и в случаи если ошибка не выявлена, контактируйте дистрибьютора.

8.5.2 Восстановление

(См. в оригинале инструкции).

8.5.3 Линейность

(См. в оригинале инструкции).

9. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**9.1 Влияющие вещества**

Любое неправильное обращение с образцами или изменение анализа может повлиять на результаты.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,25 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

Анализ содержит реагенты для минимизации влияния антител НАМА и гетерофильных. Тем не менее, очень высокие уровни НАМА или гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

9.2 Влияние лекарственных средств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), влияющие на результаты анализа.

9.3 «Хук-эффект» высокой дозы

Не было обнаружено в настоящем анализе.

10. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**10.1 Достоверность результатов**

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

10.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они

считаются достоверными согласно п. 10.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

10.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензии или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 10.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.

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
www.diameb.ua