

НАБІР РЕАГЕНТІВ ОНКОМАРКЕР СА 125 ELISA

TM-CA 125 ELISA

Кат. №: EIA-5072

Дата випуску інструкції: 2018/10
Версія 4.0



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1 ВСТУП

1.1 Призначення

Набір DRG TM-CA 125 ELISA - це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro* діагностичного визначення СА125 у сироватці та плазмі (ЕДТА-, гепаринової або цитратної плазми).

1.2 Резюме та пояснення

TM CA 125 ІФА є аналізом для виявлення реактивних детермінантів ОС 125 на гетерогенному, високомолекулярному (200-1000 кДа) глікопротеїні в сироватці. Цей глікопротеїн спочатку визначався моноклональним антитілом ОС 125, встановленим Bast et al. (1). ОС 125 реактивні детермінанти можна знайти у високому відсотку немущозного епітеліального раку пухлин і знаходяться в сироватці жінок, які несуть такі пухлини.

Значення СА 125 зростає підвищуються у більшості пацієнтів з активним епітеліальним раком яєчників, у тому числі з хворобою I стадії (2). Підвищені значення СА 125 виявляються також у 1-2% здорових осіб і можуть бути підвищені при інших захворюваннях, таких як карцинома яєчників, включаючи як доброякісні, так і злоякісні розлади (3,4).

У жінок з первинною епітеліальною карциномою яєчників, які пройшли терапію першої лінії, за якою слідували процедури діагностики другого виду, було виявлено, що показник СА 125 більше або дорівнює 35 О/мл, що свідчить про наявність резидуальної пухлини. Рівень СА125 вище 12 О/мл в кінці первинної терапії є незалежним предиктором загальної виживаності (ЗВ) та виживання без прогресування (ВБП) (5,6,7).

Значення СА 125 нижче 35 Од / мл не вказує на відсутність залишкового раку яєчників, оскільки у пацієнтів з гістопатологічними ознаками карциноми яєчників можуть спостерігатися показники СА 125 в діапазоні здорових осіб. Рекомендується, використовувати DRG TM CA 125 ELISA під наглядом лікаря, який пройшов навчання і має досвід роботи з гінекологічними раковими захворюваннями.

2 ПРИНЦИП ТЕСТУ

Даний аналіз є імуноферментним аналізом (ІФА), заснованим на принципі сендвіча.

Мікротитрувальні лунки покриті моноклональним антитілом (миші) до антигенних сайтів на молекулі СА125.

Аліквота зразка пацієнта, який містить ендogenous СА125, інкубується в лунці з нанесеним ферментним кон'югатом, який є анти-СА125 антитілом, кон'югованим з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається.

Кількість зв'язаної пероксидази пропорційна концентрації СА125 у зразку.

Після додавання розчину субстрату інтенсивність кольору, що розвивається, пропорційна концентрації СА125 у зразку пацієнта.

3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Тільки для діагностичного використання "in-vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
- Всі реагенти тестового набору, які містять людську сироватку або плазму були протестовані та підтверджені, що є негативними на ВІЛ-1/2, HbsAg та HCV схваленими процедурами FDA. Проте, всі реагенти потрібно слід розглядати як потенційно біологічна небезпека під час використання та утилізації.
- Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.

- Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °C запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
- Піпетування візців та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
- Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
- Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
- Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полоскання.
- Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °C) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності. Проте, на значення зразків пацієнтів не впливатимуть.
- Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
- Не їжте, не пийте і не курить в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
- Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
- Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
- Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
- Уникати контакту зі *Стоп-розчином*, що містить 0.5 М H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
- Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. При попаданні в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
- Субстрат ТМБ надає подразнюючу дію на шкіру та слизову оболонку. У разі можливого контакту промийте очі великою кількістю води, а шкіру - милом і великою кількістю води. Перед повторним їх використанням вимийте забруднені об'єкти. У випадку вдихання, виведіть людину на відкрите повітря.
- Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
- Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4 РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

- Мікротитрові лунки:** 12 x 8 (відривних) смужок, 96 лунок; Лунки покриті моноклональними анти-СА125 антитілами.
- Нульовий Стандарт,** 1 флакон, 3 мл, готовий до використання; Містить не-ртутний консервант.
- Стандарт (Стандарти 1-5):** 5 флаконів, 0.5 мл, готові до використання; Концентрації: 25-75-150-300-600 О/мл. Містить не-ртутний консервант.
- Контроль Низький та Високий:** 2 флакони, 0.5 мл кожен, ліофілізовані; Значення і діапазони дивіться на етикетці флакона або паспорті якості. Містить не-ртутний консервант.
- Ферментний кон'югат,** 1 флакон, 7 мл, готовий до використання, Анти-СА125, кон'югований з пероксидазою хрому. Містить не-ртутний консервант.
- Розчин субстрату,** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання. Тетраметилбензидин (ТМБ)
- Стоп-розчин,** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Містить 0.5 М H₂SO₄, Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може привести до пошкодження шкіри і опіків.
- Промивний Розчин,** 1 флакон, 30 мл (40X концентрат). Див. «Приготування реагентів»

Примітка: Додатково *Нульовий Стандарт* для розведення зразків наявний за запитом.

4.2 Матеріали, що не постачаються, але необхідні

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450 нм±10 нм) (напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Логарифмічний графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8 °С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати. Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °С. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний 8 тижнів при зберіганні, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40х концентрованого Промивного Розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного Розчину з 1170 мл деіонізованої води до об'єму 1200 мл.
Розведений Промивний Розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.

4.5 Знищення набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог місцевого регулювання. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки, Розділ 13.

4.6 Пошкоджені набори

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Серйозно пошкоджені компоненти не слід використовувати. Вони повинні зберігатись до вирішення проблеми. Після цього вони повинні бути знищені відповідно до вимог місцевого регулювання.

5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У цьому дослідженні можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА, гепаринову або цитратну плазму).

Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

Увага: зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте крові згорнутись і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для згортання крові.

Плазма:

Цільну кров слід збирати в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянти (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідним препаратом для плазми) та центрифугувати відразу ж після збору.

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8 °С до 5 днів перед дослідженням. Для довшого зберігання (до 18 місяців) зразки повинні бути заморожені до -20 °С. Після відтавання зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені 0 Стандартом і проаналізовані повторно.

Для вирахування концентрацій необхідно брати до уваги коефіцієнт розведення.

Приклад:

- a) Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл 0 Стандарту (ретельно змішайте)
- b) Розведення 1:100: 10 мкл розведення a) 1:10 + 90 мкл 0 Стандарту (ретельно змішайте).

Перекладач Романюк Н. П.

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакових інтервалів часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура аналізу

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитраційних лунок у штативи.
2. Додайте по **50 мкл** кожного **Стандарту, Контролю та зразків** у відповідні лунки кожен раз з новою насадкою.
3. Додайте по **50 мкл Ферментного Кон'югату** в кожну лунку. Ретельно змішайте протягом 10 секунд. Важливо мати повне змішування на цьому етапі.
4. Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **3 рази** розведеним Промивним Розчином (300 мкл). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків води.
Важлива примітка:
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильного виконання процедури промивання!
6. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожну лунку.
7. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку.
9. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10** нм за допомогою мікротитраційного планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання **Стоп-Розчину**.

6.3 Розрахунок результатів

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-осі проти відповідних концентрацій на Х-осі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, чим концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити або вважати як > 600 О/мл. При вирахуванні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані наведені тільки для демонстрації і **не можуть** використовуватись для отримання результатів під час аналізу.

| Стандарти | Оптичні одиниці (450 нм) |
|-----------------------|--------------------------|
| Стандарт 0 (0 О/мл) | 0.02 |
| Стандарт 1 (25 О/мл) | 0.16 |
| Стандарт 2 (75 О/мл) | 0.41 |
| Стандарт 3 (150 О/мл) | 0.75 |
| Стандарт 4 (300 О/мл) | 1.27 |
| Стандарт 5 (600 О/мл) | 1.76 |

7 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

У дослідженні, проведеному на зразках нормальних здорових дорослих пацієнтів, використовуючи набір DRG TM-CA125 ІФА, були отримані наступні дані:

| Population | n | Mean (U/mL) | Median (U/mL) | 2.5 th - 97.5 th Percentile (U/mL) | Range (min. - max.) (U/mL) |
|------------|----|-------------|---------------|--|----------------------------|
| Males | 35 | 8.90 | 6.47 | 2.40 - 20.18 | 2.13 - 20.41 |
| Females | 35 | 5.35 | 3.51 | 1.66 - 15.45 | 1.58 - 19.55 |

Клінічні дослідження рекомендують діапазон cut-off від 35 до 65 О/мл для діагностики та спостереження за раком яєчників (8-9).

Результати аналізу не можуть бути єдиною причиною для терапевтичного висновку. Результат повинен корелювати з іншими клінічними дослідженнями і діагностичними тестами.

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Гарна лабораторна практика вимагає, щоб запуск контролів виконували з калібрувальною кривою. Статистично значущу кількість контролів слід оцінювати для того, щоб встановити середнє значення і допустимі діапазони для забезпечення належної продуктивності.

Також рекомендується використовувати зразки контролів відповідно до державних і федеральних правил. Використання контрольних зразків рекомендується для щоденного забезпечення достовірності результатів. Використовуйте контролі як на нормальному так і на патологічному рівнях. Контролі та відповідні результати QC-лабораторії вказані в сертифікаті QC, доданому до набору. Значення та діапазони, вказані на аркуші QC, завжди відносяться до поточного лоту набору і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів.

Також, рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості, щоб забезпечити точність результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу значень контролю. Якщо результати аналізу не попадають у встановлений діапазон матеріалів контролю, результати є не дійсними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.25 - 600 О/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були перевірені на перехресна реактивність аналізу:

- СА 19-9 (0%),
- СЕА (0%),
- СА 72-4 (0%).

9.3 Чутливість

Аналітичну чутливість DRG ELISA обчислювали, додаванням 2 стандартних відхилень до середнього значення 20 повторів аналізів (20 реплік) аналізу стандарту 0 і склали 0.25 О/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Варіативність в аналізі

| Зразок | К-сть | Середнє, О/мл | КВ, % |
|--------|-------|---------------|-------|
| 1 | 20 | 16.9 | 5.9 |
| 2 | 20 | 26.7 | 5.8 |
| 3 | 20 | 135.8 | 4.5 |

9.4.2 Варіативність між аналізами

| Зразок | К-сть | Середнє, О/мл | КВ, % |
|--------|-------|---------------|-------|
| 1 | 40 | 19.5 | 13.8 |
| 2 | 40 | 33.8 | 10.6 |
| 3 | 40 | 82.7 | 6.5 |

9.4.3 Між лотами

| Зразок | К-сть | Середнє, О/мл | КВ, % |
|--------|-------|---------------|-------|
| 1 | 9 | 10.2 | 10.6 |
| 2 | 8 | 80.8 | 1.2 |
| 3 | 9 | 133.5 | 8.6 |

9.5 Відновлення

Зразки були насичені шляхом додавання розчинів СА125 з відомими концентраціями у співвідношенні 1:1.

Відновлення у % розраховується шляхом множення співвідношення вимірних та очікуваних величин на 100 (очікуване значення = (ендогенний СА125 + доданий СА125)/2; через розбавлення сироватки 1:2 з матеріалом

Перекладач Романюк Н. П.

насичення).

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| Concentration [U/mL] | 19.0 | 97.1 | 191.1 |
| Average Recovery [%] | 89.4 | 94.4 | 94.9 |
| Range of Recovery [%] | from | 89.1 | 91.4 |
| | to | 89.7 | 99.8 |

9.6 Лінійність

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| Concentration [U/mL] | 17.7 | 29.5 | 103.0 |
| Average Recovery [%] | 106.9 | 101.7 | 90.6 |
| Range of Recovery [%] | from | 95.8 | 90.7 |
| | to | 113.3 | 108.6 |

10 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводиться з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Перехресно діючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).

Набір містить реагенти для мінімізації інтерференції НАМА та гетерофільних антитіл. Проте, надзвичайно високої титри НАМА або гетерофільні антитіла можуть заважати результатам тестів.

10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання СА125 в зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні до 19.200 О/мл СА125.

11 ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також, користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури. Якщо у вас виникли сумніви зверніться до DRG.

11.2 Терапевтичні заключения

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Претензії, подані внаслідок неправильного тлумачення результатів лабораторних досліджень згідно з пунктом 11.2, також не є дійсними. Незалежно від того, у випадку будь-якої претензії, відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору.

Виробник не несе відповідальності за пошкодження набору під час транспортування.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

