

PATHOZYME® OVARIAN CANCER ANTIGEN 125 Ref OD287

Immunoenzymatyczny test (EIA) do ilościowego oznaczenia Antygeny Nowotworowego 125 w ludzkiej surowicy.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.
Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Nowotwór jajników jest szóstym z kolei z najczęściej występujących nowotworów u kobiet (z wyjątkiem niezłośliwych nowotworów skóry) i piątym z kolei jeśli chodzi o przyczynę umieralności z powodu raka. Jednym z kluczowych markerów choroby jest antygen nowotworowy 125.

CA 125 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 200000 – 1000000 Da. Antygen jest produkowany przez komórki rakowe nabłonka jajnika, a nie przez komórki prawidłowe. CA 125 wykryto u ponad 80% wszystkich przypadków z nowotworami jajników. Podwyższony poziom CA 125 w surowicy występuje u 6% przypadków ze złośliwymi nowotworami, pochodzenia nieginekologicznego takimi jak rak trzustki lub płuc. W wybranych przypadkach niezłośliwych nowotworów może również wystąpić podwyższenie poziomu antygeny CA 125. Do tych przypadków należą: menstruacja, endometrioza i ciąża (podczas I trymestru). Podwyższony poziom CA 125 stwierdzono jedynie u 1% osób zdrowych z grupy kontrolnej.

Monitorowanie poziomu CA 125 u pacjenta i stwierdzenie wzrostu poziomu antygeny, wskazuje na progresję nowotworu i brak odpowiedzi na zastosowane leczenie. Spadek poziomu antygeny CA 125 jest pomyślną prognozą i wskazuje dobrą odpowiedź pacjenta na zastosowane leczenie.

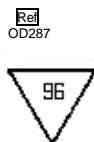
PRZEZNACZENIE

PATHOZYME OVARIAN CANCER ANTIGEN 125 jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczenia antygeny nowotworowego CA 125 w ludzkiej surowicy. Do użytku tylko w laboratorium.

ZASADA

Kubeczki mikroplastyki opłaszczane są specyficznymi, monoklonalnymi przeciwciałami anti-CA 125. Do odpowiednich kubeczków należy dodać surowicę, przeciwciała anti-CA 125 znakowane peroksydazą chrzanową (konjugat enzymatyczny) i następnie inkubować w temperaturze 37°C. Antygen CA 125 obecny w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka i koniugatem enzymatycznym, tworząc duży kompleks immunologiczny typu kanapka. Po inkubacji zagłębienia mikroplastyki zostają przepłukane wodą aby usunąć niezwiązane znakowane przeciwciała. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na obecność antygeny CA 125 w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Steżenie antygeny CA 125 jest wprost proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia. Test kalibrowano względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego standardu dla tego oznaczenia.

SKŁAD ZESTAWU



Microtitre Plate	12 x 8 wells x 1
Dzielnia mikroplastyka z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.	
Cal A	0 U/ml 1ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona antygeny CA 125. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal B	15 U/ml 1ml
Standard referencyjny: antygen CA 125 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal C	50U/ml 1ml
Standard referencyjny: antygen CA 125 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal D	100 U/ml 1ml
Standard referencyjny: antygen CA 125 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal E	200U/ml 1ml
Standard referencyjny: antygen CA 125 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal F	400U/ml 1ml
Standard referencyjny: antygen CA 125 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Conj	11ml
Anti-CA 125 HRP Koniugat: anti-CA 125 koniugat znakowany HRP. Gotowy do użycia. (Różowy)	
Subs	TMB 11 ml
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzydyna w buforze cytrynianowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Soln	Stop HCl 1M 11 ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w oczyszczonej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Instrukcja i druk protokołu.	1 + 1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.
Końcówki do pipet.
Ciepłarka: z temperaturą 37°C ± 1°C
Papier absorbacyjny.
Czytnik mikroplastyk z filtrem 450 nm.
Papier milimetry.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME CA 125 zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME CA 125 nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME CA 125 zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME CA 125 zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym w przypadku spożycia. Należy wtedy spłukać obficie wodą i udać się do pomocy medycznej.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, podanej na zestawie i poszczególnych jego składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczkach i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalne uszkodzenie.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepienia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się stosowanie świeżej surowicy.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, ponieważ wpłynę to na otrzymane wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2 - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydku sodowego jako konserwantu może on hamować aktywność zastosowanego enzymu (peroksydazy).

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek aby nie otrzymać fałszywych wyników.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej (20 - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20 - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2 - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 100µl standardów i próbek badanych. Mieszać przez 10 sekund.
5. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu koniugatu znakowanego enzymem.
6. Mieszać dokładnie przez 30 sekund. Dokładne mieszanie jest bardzo ważne na tym etapie oznaczenia. Umieścić mikroplastykę w wilgotnej komorze i inkubować 90 minut w temperaturze 37°C.
7. Po zakończeniu inkubacji odwrócić płytkę i wylać jej zawartość do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki na papierze absorpcyjnym, uderzając mocno odwróconą płytką. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
8. Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytłuszczać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorpcyjnym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
9. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorpcyjnym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
10. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorpcyjnym lub papierowym ręczniku.
11. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
12. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20 - 25°C).
13. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
14. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
15. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyk przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test może być wykonywany przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać uszkodzonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie konieczne wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być dozowane jednocześnie aby zachować jednakowe warunki przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pobierania odczynnika z oryginalnego opakowania, może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20 - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana aż do zakończenia aby kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw będzie nieaktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odtwarzalności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2 - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{450}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach U/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości CA 125 dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Stosując czytniki z oprogramowaniem wykorzystać wersję logarytmicznej krzywej regresji.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji OD450 w stosunku do odpowiednich stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,2, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

Stężenie Antygeny Nowotworowego 125 u zdrowych kobiet nie powinno przekraczać wartości 35 U/ml. Minimalne wykrywane testem PATHOZYME OVARIAN CANCER ANTIGEN 125 stężenie CA 125 wynosi 5 U/ml.

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów. Współczynnik zmienności dla testu PATHOZYME OVARIAN CANCER ANTIGEN 125 jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyne CA 125 kit i Abbott AxSym Kit użyto próbek o wartościach CA 125 pomiędzy 2.0 U/ml a 1344 U/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	153
Współczynnik korelacji	0.94
Wartość nachylenia krzywej	0.97
Punkt przecięcia z osią OY	- 0.372
Wartość średnia testem Omega	114.9 U/ml
Wartość średnia testem Abbott	119.2 U/ml

Testy wykazały dobrą korelację.

PIŚMIENICTWO

1. **Kenemans P, Yedema CA, Bon GG, von Mensdorff-Pouilly S.** CA125 in gynaecological pathology a review. Eur. J. Obstet. Gynaecol. 1993;49:115-124.
2. **Saksela F.** Prognostic markers in epithelial ovarian cancer. Intl. J. Gynaecol. Pathol. 1993;12:156-161.
3. **Farghaly S. A.** Tumour markers in gynaecologic cancer. Gynaecol. & Obstet. Invest. 192;34:65-72.
4. **Welander C, E.** What do CA125 and the antigens tell us about ovarian cancer biology. Acta Obstet. Gynaecol. Scand. Sup. 1992;155:85-93.
5. **McGowan, L.** Pathology of the ovary. Curr. Opin. on Obstet. Gynaecol. 1991;3:66-72.
6. **Olt G, Berchuck A, Bast R. C.** The role of tumour markers in gynaecologic oncology. Obstet. Gynaecol. Survey 1990;45:570-577.
7. **Nilof, J. M.** Ovarian malignancy. Curr. Opin. on Obstet. Gynaecol. 1991;3:66-72.
8. **Diez M, Cerdan F.J., Ortega, M.D., Torres, A., Picardo, A., Balibrea, J. L.** Evaluation of serum Cancer Antigen 125 as a tumour marker in non-small cell lung cancer. Cancer 1991;67:150-154.
9. **Nilof, J. M., Klug T. L., Schaezel, E.** Elevation of serum Cancer Antigen 125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium and endocervix. A. M. J. Obstet. Gynaecol. 1984;148:1057.

SKRÓCONA WERSJA WYKANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 100µl próbek badanych i standardów. Mieszać przez 10 sekund.
2. Dodać do każdego kubeczka po 100µl koniugatu enzymatycznego. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
3. Inkubować 90 minut w temperaturze 37°C.
4. Wylać zawartość z kubeczków i przemycić 5-krotnie wodą destylowaną.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
6. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20 - 25°C).
7. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
8. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8078 ISSUE 6 Revised July 2010.
© Omega Diagnostics Ltd 2010. POLISH



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY

