

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-048
Упутство за методу испитивања карбохидратног антигена 125 (CA 125)				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2024-12-24	mr ph Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Карбохидратни антиген 125 (CA 125) је антигени тумор маркер који се обично експримује у епителним неоплазмама јајника и другим ткивима, као што су ћелије које облажу ендометријум, јајоводе, плеуру, перитонеум и перикард. Откривен је коришћењем моноклонског антителијела ОС 125, развијеног имунизацијом мишева кроз излагање ћелијским линијама епителног карцинома јајника. СА 125 теста у серуму корисне су за праћење болести код пацијенткиња са инвазивним карциномом епителних ћелија јајника. У приказу публикованих студија, утврђено је да је корелација између вредности СА 125 у серуму и развоја болести 87%. Континуирани пораст вредности СА 125 повезан је са малигнитетом и лошим одговором на терапију, док снижење ових вриједности указује на повољан одговор на примјењену терапију. Повишене вриједности СА 125 утврђене су код око 1-2% здравих особа, и код особа са болестима које нису малигне као што је цироза, хепатитис, ендометриоза, први триместар трудноће, цисте на јајницима и инфламаторна болест карлице. Такође је утврђено повећање СА 125 током менструалног циклуса. Карциноми код којих су вриједности СА 125 повишене а нису повезане са јајницима су ендоцервикални карциноми, карциноми јетре, панкреаса, плућа, колона, стомака, билијарног тракта, материце, јајовода, дојки и ендометријума. СА 125 тест се не препоручује као скрининг тест за детекцију карцинома у популацији, већ као помоћ у лијечењу пацијенткиња са карциномом јајника.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Овај тест је аутоматизовано, двостепено имуноодређивање за квантитативно одређивање ОС 125 дефинисаног антигена у хуманом серуму и плазми које користи хемилуминисцентно имуноодређивање са микрочестицама (СМІА). Мјешају се узорак и парамагнетне микрочестице обложене антителијелима на ОС 125 и инкубирају. ОС 125 дефинисани антиген у узорку везује се за микрочестице обложене ОС 125. Смјеша се испира. Додаје се акридијумом обиљежени коњугат М11 и инкубира, како би се формирала реакциона смјеша. Након још једног циклуса испирања, додају се преактивирајући (pre-trigger) и активирајући (trigger) раствори. Настала хемилуминисцентна реакција мјери се у релативним свјетлосним јединицама (RLU). Директна пропорционалност постоји између количине ОС125 дефинисаног антигена у узорку и RLU детектованих оптиком анализатора. Ова метода се заснива на имунометријској сендвич конфигурацији у којој молекула СА 125 гради мост између два антителијела.

Методологија: Хемилуминисцентно имуноодређивање на микрочестицама (СМІА)

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1. Прецизност

Репрезентативни резултати испитивања унутар-лабораторијске прецизности теста помоћу CLSI-овама протокола EP05-A2 приказани су у табели 1.

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МІ-10-048
		1	2024-12-24	

Табела 1. Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (ng/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Узорак 1	120	39,3	1,83	4,7	1,89	4,8
Узорак 2	120	271,2	5,12	1,9	9,11	3,4
Узорак 3	120	570,7	10,74	1,9	15,65	2,7

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.2 Линеарност

СА 125 тест за узорке серума линеаран је у интервалу од 1.1 до 1000.00 U/mL.

3.3 Граница детекције (LOD- eng. Limit of Detection)

LOD је најмања количина аналита у узорку која се може детектовати. LOD за СА 125 у серуму је 0,3 U/mL.

3.4 Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација аналита која се може одредити уз одговарајућу тачност и прецизност. LOQ за СА 125 у серуму је 0,6 U/mL.

3.5 Поређење метода

Резултати добијени одређивањем СА 125 у серуму на Alinity ci анализатору упоређени су са резултатима добијеним на ARCHITECT анализатору Passing-Bablok регресионом анализом.

Табела 2. Поређење метода Alinity ci CA125 vs ARCHITECT ci CA 125

врста узорка	јединица	n	коэффициент корелације	одсјечак на у ос	нагиб	интервал концентрације
серум	U/mL	129	1,00	-0,55	0,95	2,7-982,3

4. ВРСТА УЗОРКА

Врста узорка: За тестирање се могу користити узорци серума и плазме.

Чување узорка: Анализа узорка се врши у што краћем временском периоду. Избјегава се вишестрано замрзавање и одмрзавање узорка. Ако се узорци не тестирају у року од 24 сата

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МІ-10-048
		1	2024-12-24	

серум или плазма се одвајају од угрушка или гела у епрувети. Стабилност узорака приказана је у табели 3.

Табела 3. Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања
серум/плазма	
2 до 8 °C	≤7 дана
-20 °C и нижа t	>7 дана

Транспорт узорка: Узорке до мјеста обраде је потребно доставити у одговарајућем положају и на сталцима, при чему крв не смије да буде у додиру са чепом. Препоручено вријеме доставе до лабораторије је 2 сата од узимања узорка.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Препорука је да се узорак крви узима наште, ујутру најмање 12 сати након последњег obroka, као и да вријеме за вађења крви буде између 7 и 10 h. Дан прије вађења крви треба узимати уобичајне оброке, али не премасне. За вечеру конзумирати лакшу храну. Вечера треба да буде најкасније до 19 h. Послије 19 h може се пити течност, изузев алкохола, кафе и претјерано заслађених напитака. Дан прије узимање крви треба избјежавати интензивну физичка активност. На дан узимања крви, ујутру, не треба ништа јести, пити ни пушити.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације са или без гела. Када се пареметар одређује из плазме узорковање крви се врши у епруветама са литијум/натријум хепарином (сиви чеп) и K-EDTA (љубичасти чеп) као антикоагулансима.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: реагенс сет, *Alinity ci*, *Abbott* анализатор заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице. Сет реагенаса за одређивање СА125 је у течном облику, спреман за употребу и садржи један реагенс, чије су компоненте приказане у табели 3.

Сет реагенаса за одређивање СА 125 је у течном облику, спреман за употребу и садржи два реагенса, чије су запремине и компоненте приказане у табели 4.

Табела 4. Компоненте реагенса СА 125

Реактивне компоненте	Минимална концентрација
<i>Microparticles:</i>	
Микрочестице обложене антителима СА 125 (мишија, моноклонска) у TRIS пуферу са протеинским стабилизаторима	0,09 %
- Цитратни пуфер - Протеински (говеђи) стабилизатор	

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-048
		1	2024-12-24	

- Конзерванс: натријум азид и ProClin 300

Conjugate:

- Акридиномобилеженкоњугатантитијела на
СА 125 (мишија, моноклонска)
уфосфатномпуферусапротеинским
стабилизаторима 0,075 µg/mL

- Конзерванс: Натријум азид и ProClin 300

Додатниматеријалипотребниизвођењетестасу: *CA 125Calibrators; Multichem IA plus Controls, Pre-Trigger Solution, Trigger Solution и Wash Buffer.*

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтјевају испитивања која се спроводеи прописане су у упутству *УП-10-138: Обезбјеђење и праћење услова средине у процесу испитивања*. У просторији у којој је смјештен апарат, температура је прилагођена условима који су прописани од стране произвођача опреме и захтјевима испитивања. Температура се одржава на вриједностима до 25 ° С, што се евидентира у *обрасцу ОБ-10-221: Евиденција температуре*.

Упутством *УП-10-137: Мјере заштите на раду у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*, прописују се мјере заштите на раду.

Овај тест захтијева руковање хуманим узорцима. Сваки узорак крви или другог биолошког материјала који се достави у лабораторију је потенцијално инфективан, па је неопходно да се са овим материјалом крајње пажљиво рукује. То значи да приликом манипулације узорцима и при раду са апаратом треба користити рукавице за једнократну употребу, као и друга заштитна средства.

Подаци о идентификацији хемикалија, опасности, мјерама прве помоћи и осталим подацима везаним за безбједност примјенереагенса СА 125 се налази у Безбједоносним листовима везаним за *Alinity ci CA 125 Reagent Kit* као и у упутству *УП-10-166: Упутство за безбједно руковање хемикалијама у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Калибрацијасеврши 4PLCметодом (енгл.4-parameterlogisticcurvefitdatareductionmethod), гдјесекаокалибраторикористе СА 125Calibrator. Калибрација јепотребнанакон сваке промјене серије реагенса (лот) и акосу контролеизванприхватљивихраспонаконцентрација.Калибратори се тестирају у дупликату.Ваљаност калибрације се провјерава спровођењем интерне контроле квалитета.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Прије постављања реагенс сета на анализатор бочице са микрочестицама се добро промјешају, како би се извршило потпуно суспендовање честица.
2. Прије анализе узорака, спроводи се интерна контрола квалитета и по потреби калибрација.
3. Запремина узорака за први тест је 150 µL (у режиму за хитно тестирање 75 µL), запремина узорка за сваки додатни тест који се изводи на узорку из исте чашице је 25 µL
4. Узорци се стављају у епрувете или чашице са бар кодовима пацијената на носаче, сталке (*carrier*).

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-048
		1	2024-12-24	

5. Након постављања узорак на транспортни модул врши се њихова идентификација скенирањем бар кода, након чега се врше аналитички процеси испитивања узорка.
6. Поступак аналитичког процеса је следећи:
 - a. У реакциону посуду са узорком се пипетирају парамагнетисане честице са антителима на СА 125(сепарациона антители), након чега се врши мјешање реакционе смјеше
 - b. Реакциона смјеша се инкубира, а анализи из узорка се везују за антители на парамагнетисаним честицама, стварајући имунски комплекс
 - c. Магнет привлачи парамагнетисане микрочестице (везане за испитивани аналит) на зид реакционе посуде
 - d. Зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле неvezана једињења
 - e. У реакциону смјешу се пипетира хемилуминисцентни коњугат обиљежен акридинијумом, коњугат се веже за имунски комплекс да би довршио реакцију
 - f. Реакциона смјеша се инкубира и зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле неvezана једињења
 - g. Pre-trigger солуција (натријум хидрокси) обезбјеђује базну средину, спречава рану емисију свјетлости, спречава агрегацију микрочестица и раздваја обиљеживача акридинијум од коњугата
 - h. Trigger солуција, активацијски раствор (натријум пероксид), који представља оксидациона средство, у базној средини, доводи до реакције оксидације акридинума, ексцитирани производи формирани у реакцији оксидације након тога емитују свјетлост-хемилуминисценција

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета спроводи се примјеном контролних материјала које препоручује произвођач, а то су *Technopath Multihem IA Plus* ниво 1, *Technopath Multihem IA Plus* ниво 2 и *Technopath Multihem IA Plus* ниво 3. Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, сваког дана, прије почетка спровођења рутинских анализа. Такође, контрола квалитета се спроводи при промјени серије реагенса или калибратора (лот). Резултати статистичке обраде при интерној провјери аутоматски се приказују на контролној карти која се креира за сваки параметар посебно, чиме се оцијењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је вриједност контролног узорка унутар двије стандардне девијације метода је под контролом и резултати пацијената се могу издати.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА,БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Потенцијалне интерференције са хемоглобином, билирубином, триглицеридима и протеинима у СА 125 тесту, при наведеним концентрацијама је <12 %.

Хемоглобин: 500mg/dL

Билирубин: 20 mg/dL

Триглицериди: 3 g/dL

Протеини: 12 g/dL

Циклофосфамид: 500 µg /mL

Доксорубин: 1.16 µg/mL

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-048
		1	2024-12-24	

Леуковорин: 2.68 mg/mL

Метотрексат: 45 µg/mL

Паклитаксел: 3.5 ng/mL

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Принцип одређивања и израчунавања концентрације СА 125 сазнајем методом 4PLC, гдје анализатор мјери хемилуминисцентну емисију калибратора, мјерењем реалтивних свјетлосних јединица (RLU) и генерише калибрациону криву, док при анализи мјери хемилуминисцентну емисију анализата, коју анализатор аутоматски конвертује у концентрацију.

Мјерна несигурност за СА 125 је $\pm 1,58\%$.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за СА 125 препоручен од стране произвођача је $< 35,0 \text{ U/mL}$.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Интервал извјештавања о резултатима испитивања за СА 125 представља 1 до $1000,0 \text{ U/mL}$.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорци у којима су концентрације СА 125 изнад $1000,00 \text{ U/mL}$, могу се разблажити аутоматски или ручно. Анализатор разблажује узорак у односу 1:10 и аутоматски израчунава концентрацију множењем резултата фактором разблаживања. По потреби се може направити додатно ручно разблажење од 1:10. Ако оператер не унесе фактор разблажења, добијена концентрација се мора ручно помножити са одговарајућим фактором разблажења прије издавања резултата.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

За постављање дијагнозе и праћење тока болести, потребно је узети у обзир карактеристике пацијента, тренутну клиничку слику, ранија и тренутна обољења или патолошка стања, терапију коју пацијент прима и др., како би се лабораторијски налаз исправно интерпретирао. Ако резултати СА 125 теста нису у складу са клиничким налазима, препоручује се додатно тестирање. Континуирани пораст вриједности СА 125 повезан је са малигнитетом и лошим одговором на терапију, док снижење ових вриједности указује на повољан одговор на примењену терапију. Повишене вриједности СА 125 утврђене су код око 1-2% здравих особа, и код особа са болестима које нису малигне као што је цироза, хепатитис, ендометриоза, први триместар трудноће, цисте на јајницима, и инфламаторна болест карлице. Такође је утврђено повећање СА 125 током менструалног циклуса. Карциноми код којих су вриједности СА 125 повишене а нису повезане са јајницима су ендодеривални карциноми, карциноми јетре, панкреаса, плућа, колона, стомака, билијарног тракта, материце, јајовода, дојки, и ендометријума. Пацијенти с потврђеним канцером јајника могу имати вриједности теста СА 125 у истом опсегу као и здраве особе. Повишене вриједности циркулишућег ОС 125 дефинисаног антигена су могуће и код пацијената са

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-048
		1	2024-12-24	

немалигним болестима. Због тога вриједности СА 125 теста не могу да се тумаче као маркери присуства или одсуства малигнитета. Ниво СА 125 требало би да се користи заједно с информацијама доступним из клиничке евалуације и других дијагностичких процедура. СА 125 тест не смије да се користи за скрининг карцинома. СА 125 тест се не препоручује као скрининг тест за детекцију карцинома у популацији, већ као помоћ у лијечењу пацијенткиња са карциномом јајника.

Повишене вриједности: >35,0 U/mL

Снижене вриједности: /

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Егзогенифакториваријабилности за одређивање СА 125 су аутоантитијела у хуманом серуму. Хетерофилна антитела у хуманом серуму могу да реагују с имуноглобулинима у реагенсу и интерферирају у *in vitro* имуноодређивањима. Пацијенти који су свакодневно у контакту са животињама или производима серума животиња могу да буду склони овој интерференцији и код њих могу да се уоче аномални резултати. Додатне информације могу бити потребне за постављање дијагнозе. Узорци пацијената који су примали мишја моноклонска антитела у дијагностичке или терапијске сврхе могу да садрже хумана анти-мишја антитијела (НАМА). Такви узорци могу да покажу лажно повишене или снижене вриједности када се тестирају сетовима тестова као што је СА 125 који користе мишја моноклонска антитела. Додатне клиничке или дијагностичке информације могу да буду потребне за одређивање статуса пацијента.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. СА125 тест, Упутство произвођача за одређивање СА 125 на *Alinity* с анализаторима - преведено на српски језик, 2023.
2. Мајкић-Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд
3. Хоновић Л. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријеманалитичку фазу лабораторијске дијагностике? Гласник пулске болнице, 10 (10), 21-25.
4. Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.
5. Ћорић, Ј. (2014). Контрола квалитете рада у лабораторијској медицини. Факултет здравствених студија. Сарајево
6. Безбједносни лист-Alinity i СА 125 Reagent Kit. Abbott Laboratories, 2023
7. Ристић С., Пухало-Сладоке Д., Тошовић Д. (2013). Туморски маркери. Биомедицинска истраживања. 4 (2); 48-60