

hCEA [¹²⁵I] IRMA készlet (REF: RK-38CT)

A ¹²⁵I-hCEA IRMA készlet humán szérumban carcinoembrionális antigén (hCEA) tartalmának *in vitro* direkt meghatározására szolgál, a 0 - 180 ng/ml mérési tartományban. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 41 minta hCEA koncentrációja határozható meg.

Bevezetés

A Carcino-embriális antigén (hCEA) kb. 180-200kD molekulatömegű sejtfelszíni glikoprotein ami az embrionális fejlődés során a pankreasban és a gastrointestinalis traktusban képződik. Felvett korban a CEA szintézis lényegesen csökken. Emelkedett CEA érték fordulhat elő néhány jóindulatú megbetegedésben pl. hepatitis, pankreatitis, gastritis, bronchitis, cirrhosis, diverticulitis valamint eros dohányosok esetében. Emelkedett CEA koncentráció figyelhető meg különböző daganatos megbetegedésekben (colorectális, pankreasz, tüdő, emlo, egyéb gastrointestinalis, onkológiai, medulláris pajzsmirigy carcinoma).

A rák korai, tünetmentes állapotban való felismerésére illetve szűrésre a CEA nem alkalmas a jóindulatú betegségeknél mért emelkedett koncentráció miatt valamint mert nem mutat lokalizációs specificitást. Jól alkalmazható a daganatos betegségek monitorozására és a terápia követésére. Magasabb preoperatív CEA szint rosszabb prognózist jelent. A postoperatív magas CEA koncentráció reziduális tumorra utal. A mutétet követően normalizálódott CEA szint hirtelen növekedéséből metasztázis jelenlétére lehet következtetni.

A mérés elve

A mérőkészlet a szilárd fázisú immunoradiometrikus assay (IRMA) működési elvét alkalmazza. Ehhez két olyan monoklonális antitest szükséges, amelyek a molekula két különböző epitopját ismerik fel. A két antitest egyike radiojóddal jelzett (jelző antitest), a másikuk jelöletlen (ún. "capture" antitest). A bevont csöves rendszerek jelen változatában az antigénnek a két antitesttel kialakult immunkomplexe ("szendvics") reaktív kémcső felületén mint szilárd fázison kötődik meg. 2 órási reakcióidőt követően a reaktíveleget a kémcsőből kiöntjük, és pufferes mosás után gamma-számlálóval mérjük a radioaktivitást. A kémcsővekben mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő hormon koncentrációjával. Az ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbéről az ismeretlen minták koncentrációit kötési értékeik alapján visszaolvassuk.

A készlet tartalma

- 1 flakon ¹²⁵I-TRACER (21 ml), pufferes oldat radioaktivitása <740kBq, 0,1 % nátrium-azidot tartalmaz.
- 7 üveg STANDARD (7 x 1 ml), humán szérumban, 0,1 % nátrium-azid tartósítósóval, koncentrációjuk (S0 - S6): 0, 1,6, 3, 10, 30, 90, 180 ng/ml. (WHO 1st IS 73/601 Int.Std.-ra kalibrálva).
- 1 flakon HÍGÍTÓ SZÉRUM (5 ml), 0,1 % nátrium-azidot tartalmaz.

3. 2 üveg ELLENORZO SZÉRUM, liofilizált, 0,1% nátrium-azid tartósítósóval, rekonstituálendő 0,5 ml desztillált vízzel. Koncentrációját a kísérő minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.

5. 2 doboz BEVONT CSŐ, 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt muanyag dobozban.

6. MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM, (20 ml), 0,1 % nátrium-azid tartósítósóval, 700 ml desztillált vízzel hígítandó.

1 db Minőségellenőrzési bizonylat
1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, rugalmas kémcsőörögző kiképzésben, pipetták (50µl, 200µl és 2 ml térfogatra, eldobható muanyag hegyekkel), rázógép, örvénykevero (vortex), kémcsőzáró muanyag fólia, papírvatta vagy itatóspapír, desztillált víz, gamma-számláló.

Ajánlott:

Sorozat-adagoló (ismétlő) pipetta; folyadéküveges leosztó (diszpenzer), 1 literes folyadékdénnnyel, 2 ml adagolási térfogatra.

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

Amennyiben a CEA meghatározás a mintavételt követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat 2-8°C-on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on mélyhűtve tartjuk. A fagyasztott mintákat hagyjuk felolvadni, és felhasználás előtt alaposan homogenizáljuk. Kerüljük az ismételt visszafagyasztást. Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumban nem használunk mérésre.

A legmagasabb standard értéknél magasabb koncentrációjú mintákat a mintahígítóval történő tízszeres hígítás után ismételt mérjük meg.

A reagensok elokészítése, tárolása

A készlet komponensei az első felnyitást követően 2-8°C-on tárolhatóak a készlet lejárati idején belül. A pontos lejárati idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve.

A mosóoldat koncentrátumot öntsük hozzá 700 ml desztillált vízhez. A hígított mosóoldatot 2-8°C-on tároljuk a készlet lejáratiáig.

A liofilizált ellenorzo szérumban rekonstituáljuk 500 µl desztillált vízzel, örvénykeverővel homogenizáljuk, ügyelve a habzás elkerülésére. A rekonstituált oldatot 20 percig még ne használjuk fel. A rekonstituált ellenorzo szérumban 2-8°C-on a készlet lejáratiáig tárolható.

FIGYELEM!

A mérés megkezdése előtt a reagens oldatokat, és a mérendő mintákat is engedjük szobahőmérsékletre melegedni.

A meghatározás menete (ld. Folyamatábra, 1. Táblázat)

- Jelöljük meg két-két bevont csövet a standardok (0-180 ng/ml), a kontrollok és a minták számára. A total beütésszám mérésére két nem bevont csövet célszerű feliratozni.
- Homogenizáljuk minden reagenst és a mérendő mintákat enyhe vortexeléssel, ügyelve a habzás elkerülésére.

3. Pipettázunk 50 µl standardot, ellenorzo szérumban és mintát a megfelelően jelölt bevont csövek aljába. Használunk olyan csőtartó állványt, amely szorosan, elmozgásmentesen tartja a csöveket.

4. Pipettázunk be 200 µl tracetrt minden csöbe. A total csöveket ezután tegyük félre, mert csak a gamma számlálásnál lesz szükség rájuk.

5. A csőtartó állványt rögzítjük a rázógép tálcajára, gumi leszorítóval vagy más módon stabilizálva. A beállított RPM érték 400 - 600 között adja a legalkalmasabb keverési módot, de a rázógép típusától függoen ettől eltérhetünk. **(Figyelem, hibaforrás! Kevertetésre csak olyan kémcsőtartó használható, amelyben a csövek rögzítve vannak. "Lötyögös" állványban a kémcsövek tartalma egyáltalán nem, vagy egyenetlenül keveredik, annak ellenére, hogy maga az állvány, és a kémcső mozgásban van. Egyetlen, illetve tökéletlen keverés teljesen hamis mérési eredményekhez vezethet!)**

6. Inkubáljuk 2 órán át, rázatás közben, szobahőmérsékleten (20 - 25 °C).

7. Adjunk minden csövhöz 2,0 ml mosópuffert. A csőtartót fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülűszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percig. Gyozodjunk meg arról, hogy a cső peremén nem maradtak folyadékcspek.

8. Ismételjük meg a 7-es mosási lépést még kétszer.

9. Mérjük meg az egyes csövek radioaktivitását gammaszámlálóval legalább 1 perces számlálási idővel.

10. Értékeljük ki a minta koncentrációkat grafikus módon vagy a számláló szoftvere segítségével.

Az eredmények számítása

A számítás menetét jellemző mérési adatokkal szemléltetjük. A kapott számadatoknak, és a kalibrációs görbének hasonlítaniuk kell a 2. táblázathoz, illetve az 1. ábrához.

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét. Log-log papíron ábrázoljuk a standard koncentrációkhoz tartozó átlag cpm értékeket.

Olvassuk le a mérendő minták koncentrációit a standard görbéről az átlag cpm értékek alapján.

A gépi adat-kiértékelések, vagy minőségellenorzo mérések általában nem a beütésszámokkal, hanem normált kötési értékekkel számolnak. Erre a B/T értékek használhatók, amelyek számításához a standardok, illetve minták NSB-vel (azaz az So beütésszámával) korrigált értékeket osztjuk a total aktivitással az alábbi egyenlet szerint:

$$S_{1-6}/M_{x}/(\text{cpm}) - S_0(\text{cpm})$$

$$B/T (\%) = \frac{S_{1-6}/M_{x}/(\text{cpm}) - S_0(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitásmérését követő azonnali ("on-line") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez speciálisan immunometrikus assayre kifejlesztett spline illesztő program használatát javasoljuk. Ügyeljünk arra, hogy vannak olyan kiértékelő programok, amelyek a 0-standard és az első standard között is interpolálnak, de a számított koncentrációk közül csak azok tekinthetők valószínűk, amelyek értéke magasabb, mint a mérés statisztikailag meghatározott kimutatási határa (ld. ÉRZÉKENYSÉG).

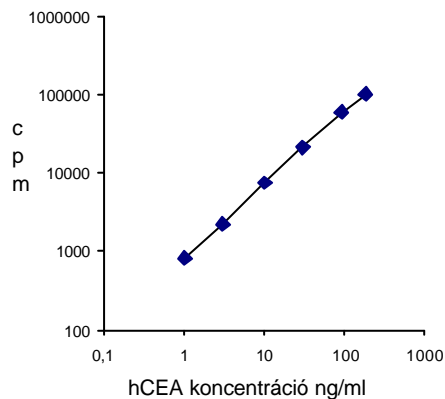
Egy jellegzetes mérési adatsort foglal össze a 2. Táblázat.

1. Táblázat Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	T	S0-S6	C	M
Standard		50		
Minta			50	
Ell. szérum				50
Tracer		200	200	200
Kevertetés, 2 óra szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatós papíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatós papíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatós papíron				
Radoaktivitás mérés (min. 60 sec/cso)				
Adatfeldolgozás				

2. Táblázat Jellemző mérési eredmények

	hCEA ng/ml	cpm	Átlag cpm	B/T%
T		307879 310574	309211	
S0	0	81 88	85	0,027
S1	1.6	1900 1898	1899	0,59
S2	3	3461 3387	3424	1,08
S3	10	10679 10443	10712	3,44
S4	30	33306 33520	33413	10,78
S5	90	87390 89529	88460	28,58
S6	180	143200 143211	143205	46,28



1. ábra

Tipikus standard görbe, (Mintameghatározásra nem használható!)

Minőségi jellemzők

Az assay jellemző paraméterei

NSB/T < 0.03%

$B_{max}/B_0 > 1500$

Specifitás

A készletben alkalmazott monoklonális antitestekkel nem tapasztalható keresztreakció normál fiziológiai koncentrációban lévő NCA-val.

Érzékenység

Jelen készlettel az **analitikai érzékenység** vagy alsó kimutatási határ a 0-standarddal 15 párhuzamos mérésből meghatározva **0,05 ng/ml**, 1 hónapos tracernél. Értéke egyenlo a 0-standard $B_0 + 2 \cdot SD$ kötési értékéhez tartozó koncentrációval.

Funkcionális érzékenység alatt azt a legkisebb koncentrációt értjük, amely már szignifikánsan különbözik a zero koncentrációtól az inter-assay precíziós profil statisztikája alapján (22 % CV).

A **funkcionális érzékenység**: < 0.4 ng/ml.

Pontosság

Az intra-assay pontosságot 10 párhuzamosmal egy sorozaton belül, 5 mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Minta	Párhuzamos száma	Átlag ng/ml	SD ng/ml	CV %
1	10	3.12	0.12	4.0
2	10	5.01	0.05	3.1
3	10	34.16	0.41	1.2
4	10	52.20	1.36	2.6
5	10	80.06	1.12	1.4

Reprodukálhatóság

Az inter-assay pontosságot 3 párhuzamosmal, 15 független mérésben értékelve, 5 mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Minta	Mérés száma	Átlag ng/ml	SD ng/ml	CV %
1	15	0.40	0.04	9.52
2	15	3.01	0.18	6.00
3	15	11.13	0.59	5.29
4	15	22.30	0.97	4.37
5	15	47.66	1.89	3.98

Linearitás – hígítási teszt

Egyedi humán szérum mintákat hígítottunk a készletben lévő hígító szérummal 2, 4, 8 és 16-szorosra. A hígítási faktorokat mérlegesen pontosítottuk.

Minta sorszám	Hígítási faktor	Várt érték ng/ml	Mért érték ng/ml	Visszanyerés %
1	1		51.12	
1	1.995	25.62	26.76	104.4
1	4.089	12.50	13.05	104.4
1	8.025	6.37	6.70	105.2
1	15.665	3.26	3.42	104.9
2	1		18.57	
2	2.030	9.15	9.16	100.1
2	3.991	4.65	4.75	102.1
2	8.105	2.29	2.31	100.9
2	14.975	1.24	1.21	97.6
3	1		39.24	
3	2.068	18.97	19.46	102.6
3	4.138	9.48	9.73	102.6
3	8.133	4.82	4.95	102.7
3	15.686	2.50	2.59	103.6
4	1		135.23	
4	2.069	65.36	68.40	104.6
4	4.062	33.29	35.83	107.6
4	7.832	17.27	18.64	107.9
4	15.497	8.73	9.43	108.0
5	1		9.57	
5	1.989	4.81	4.91	102.1
5	4.167	2.30	2.42	105.2
5	7.923	1.21	1.28	105.8
5	15.967	0.60	0.62	103.3

Ismert mennyiség visszanyerése (Recovery)

Egyedi humán szérummintákba (5 minta) ismert mennyiségű hCEA-t mértünk be (3 különböző koncentráció). Vizsgáltuk az alap és megemelt koncentráció szinteket, összehasonlítottuk a várt és mért eredményeket. Az átlag visszanyerés (recovery): $104.3 \pm 5.01\%$, tartomány: 95% - 115%.

Nagy-dózisú Hook effektus

Az effektus 15000 ng/ml alatt nem jelentkezik.

Várható referens tartomány

Egészséges felnőttél a normál CEA koncentráció általában: <3.0 ng/ml.

Dohányosoknál: <5.0ng/ml.

A megadott referens tartomány csak tájékoztató adatnak tekintendő, és nem helyettesítheti a készletet felhasználó laboratóriumok saját területükre jellemző normálértékének megállapítását.

Egyéb tudnivalók

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó CEA készletének komponenseivel.

Biztonsági óvrendszabályok

Radioaktivitás










A készlet radioaktív anyagot tartalmaz. A felhasználó laboratóriumok felelőssége, hogy munkájuk során ill. a védőcsomagolás esetleges sérülése esetén a radioaktív anyagok tárolására, felhasználására, és kezelésére vonatkozó törvényi szabályozás és hatósági előírások szerint járjanak el.

Fertőzésveszély

A készletben lévő humán szérumot tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérum HIV-Ab és HBsAg vizsgálatra negatív eredményt adott. Ennek ellenére a humán szérumot tartalmazó komponenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni, és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani.

Mérgező anyagok

A készlet komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 74 mg. A nátrium-azid nemcsak mérgező anyag, de belőle rézzel, vagy ólommal érintkezve robbanásveszélyes azidok is keletkezhetnek. A mérgezés a laboratóriumi munkák általános biztonsági előírásainak betartásával kerülhető el. A nehézfém-azidok keletkezésének megakadályozására a nem-radioaktív hulladék reagenset nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatornahálózatba.

	Lejáratási idő	CONTROL	Kontroll
	Gyártási szám	CAL	Standard
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok	CT	Bevont cső
	Biológiai veszély	TRAC	Tracer
	Lásd használati utasítás	WASHB	Mosó puffer
	In vitro diagnosztikai eszköz		2-8°C-on tárolandó
	Gyártó	DIL	Hígító szérum
REF	Katalógus szám		Radioaktív anyag



WEB oldal: <http://www.izotop.hu>

Technikai e-mail: immuno@izotop.hu

Kereskedelmi e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

IZOTÓP INTÉZET Kft.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Tel.: 392-2577, Fax: 395-9247