

НАБОР CA125 [¹²⁵I] IRMA

(Номер по каталогу: RK-125CT и RK-125CT50)

Набор предназначен для прямого количественного определения *in vitro* онкомаркера антигена CA 125 в сыворотке человека *in vitro* в диапазоне 0-500 Ед/мл. Каждый набор содержит материал, достаточный для 100 или 50 аналитических пробирок, позволяющий построить одну калибровочную кривую и провести количественное определение 42 (RK-125CT) или 17 (RK-125CT50) неизвестных образцов в двух экземплярах.

Введение

CA125 является целомическим антигеном, родственным эпителиальной ткани, который переносится высокомолекулярным гликопротеиновым комплексом (200-1000 кДа). Впервые он был обнаружен при помощи моноклонального антитела OC125, которое было получено при иммунизации мышей клеточной линией OVCA 433. Клетки OVCA 433 были получены из папиллярной серозной цистаденокарциномы яичника (Bast et al., J Clin Invest 68:1331-1337, 1981).

CA125 экспрессируется при большинстве эпителиальных опухолей яичников, особенно немүцинозного типа. Главным образом высокие уровни CA125 в сыворотке крови определяются при раке яичников, но могут также наблюдаться в меньшей степени при других опухолях (молочной железы, ободочной кишки, легких, поджелудочной железы, матки и печени) и при доброкачественных состояниях (эндометриоз, перикардит, цирроз печени, менструации и во время первого триместра беременности).

Количественное определение CA125 не информативно в качестве скрининга. Однако, этот метод представляет существенный клинический интерес для дифференциального диагноза рака яичников, для оценки эффективности лечения, ранней диагностики рецидива после терапии первой линии и для отдаленного наблюдения пациентов в период ремиссии.

Принцип метода

Технология предусматривает использование двух высокоаффинных моноклональных антител в системе иммуно-радиометрического анализа (IRMA). Сигнальные антитела, меченные ¹²⁵I (OC125*) связываются с антигенным эпитопом молекулы CA125, который пространственно отличается от распознанного биотин-связанного антитела

(M11*). Эти два антитела реагируют одновременно с антигеном в стандартах или образцах, что приводит к формированию комплекса **связанное антитело - антиген – сигнальное антитело**, который также называется «сэндвич».

Во время двухчасовой инкубации при непрерывном перемешивании иммунный комплекс оседает на поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь удаляется, пробирки тщательно промываются с последующим определением радиоактивности в гамма-счетчике. Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество CA125, может быть определена искомая концентрация CA125 в образцах пациента.

*Антитела Fujirebio Diagnostics Inc

**Содержание набора**

1. Один флакон МЕТКИ (11 мл), готовой к использованию, содержащий <math>< 980 \text{ кБк } ^{125}\text{I}</math>-анти- CA125 антитело и биотин-связанное антитело в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.
2. Один флакон (10 мл) НУЛЕВОГО СТАНДАРТА (S0) в лошадиной сыворотке с 0.1% NaN₃.
3. Пять флаконов СТАНДАРТОВ S1-S5 (5 x 1,0 мл), содержащих 15-30-80-200-500 ЕД/мл CA125 в человеческой сыворотке с 0.1% NaN₃. *Оценка калибровки была выполнена с использованием Fujirebio Diagnostics Inc. CA125II RIA.*
4. Два флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (1 мл), содержащие приблизительно 50 ЕД/мл и 100 ЕД/мл CA125 в человеческой сыворотке с 0.1% NaN₃. Концентрации контрольных сывороток указаны в прилагаемом сертификате качества.
5. ПРОБИРКИ С ПОКРЫТИЕМ, готовые к использованию.
Пробирки с покрытием для проведения реакции, 12x75 мм, упакованные в пластмассовые коробки (RK-125CT: 2 коробки, 2x50 пробирок; RK-125CT50: 1 коробка, 1x50 пробирок).
6. Один флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащий 0.2% NaN₃. См. раздел «Подготовка реактивов».

Сертификат качества.

Листок-вкладыш.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

- общее лабораторное оборудование
- высокоточные микропипетки 100 мкл
- автоматические пипетки 100 мкл
- автоматические пипетки 2000 мкл или диспенсер
- горизонтальный шейкер (как минимум 600 оборотов в минуту)
- полимерная плёнка для запечатывания пробирок
- абсорбирующая ткань
- гамма-счётчик с программным обеспечением

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии со стандартными процедурами, применяемыми в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8°C, если исследование проводится в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°C). Замороженные образцы должны быть разморожены и тщательно перемешаны перед оценкой. Следует избегать использования гемолизированных и липемических образцов сыворотки. *Образцы с концентрацией CA125 свыше 500 ЕД/мл должны быть разведены нулевым стандартом S0 и повторно оценены. Рекомендуемое разведение: 10-кратное (450 мкл S0 + 50 мкл образца).*

Подготовка реактивов, хранение

После вскрытия реактивы следует хранить при температуре 2-8°C. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до окончания срока годности набора. Фактический срок годности указан на упаковке и в сертификате качества. Чтобы получить промывной раствор (720 мл), добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к дистиллированной воде (700 мл). Приготовленный раствор следует хранить при температуре 2-8°C до окончания срока годности набора.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Перед использованием тщательно перемешайте все реактивы и образцы. Избегайте чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1).

1. Промаркируйте по два экземпляра пробирок с покрытием для каждого стандарта (S0-S5), исследуемого образца и контроля. Для определения

общей радиоактивности (Т) можно дополнительно промаркировать 2 обычные пробирки.

- Поместите с помощью пипетки по 100 мкл стандартов, исследуемых образцов и контролей в соответствующим образом промаркированные пробирки. Закрепите пробирки в штативе. Не касайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
- Поместите по 100 мкл метки в каждую пробирку.
- Запечатайте все пробирки полимерной пленкой. Прочно зафиксируйте штатив с пробирками на пластине шейкера. Включите шейкер и установите необходимую скорость с тем, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (рекомендуемая скорость: 600 оборотов в минуту).
- Инкубируйте пробирки в течение 2 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании.
- В каждую пробирку добавьте по 2.0 мл разведённого промывочного буфера. Перевернув штатив, слейте супернатант из всех пробирок. В перевернутом положении поместите штатив на фильтровальную бумагу на 2 минуты.
- Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 6 еще два раза.
- Определите радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение не менее чем 60 секунд
- Рассчитайте концентрацию СА125 в образцах так, как это описано в разделе «Расчет результатов» или используя специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения. Методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Общее количество	Стандарт	Контроль	Образец
Стандарт		100		
Контроль			100	
Образец				100
Метка	100	100	100	100
Перемешивайте в течение 2 часов при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на				

фильтровальной бумаге
Подсчитать радиоактивность (60 секунд/пробирка)
Рассчитать результаты

Дополнительный протокол

Инкубирование может проводиться в течение **60 минут**. Ниже в таблице приведены типичные значения в минуту (срм) для «свежей» и «старой» метки:

метка	«старая»		«свежая»	
	2 часа	1 час	2 часа	1 час
T	206237	210354	409715	410542
S0	584	560	770	636
S1	2038	1607	3736	3001
S2	3358	2769	6684	5844
S3	7744	6548	16940	15032
S4	17810	16225	41371	36454
S5	42288	35869	96341	84572

Расчёт результатов

Расчёт результатов представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные количественного определения должны быть сходными с данными, указанными в таблице 2.

Рассчитайте среднее значение радиоактивности в минуту (СРМ) для каждой пары образцов.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца, соответственно, используя следующую формулу:

$$S_{1-5} / C_{1-п} / M_x \text{ (срм)} - S_0 \text{ (срм)}$$

$$B/T \text{ (\%)} = \frac{\text{результат}}{T \text{ (срм)}} \times 100$$

Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте калибровочную кривую, откладывая рассчитанные значения В/Т (%) для каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации СА 125 по другой.

Определите концентрацию СА125 неизвестных образцов с использованием калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, лежащие вне диапазона концентраций калибровочной кривой.

Из доступных компьютерных программ для обработки данных с целью аппроксимации могут использоваться сплайновые методы.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Среднее (срм)	В/Т%	СА125 ЕД/мл
T	291557		
S0	278	0.1	
S1	2177	0.7	
S2	3610	1.2	
S3	8361	2.9	
S4	20729	7.1	
S5	46876	16.1	
CI	5642	1.9	51.7
СИ	10973	3.8	105.9

Рабочие характеристики

Специфичность

Использование антител в этом количественном определении гарантирует измерения, полностью специфичные для СА125.

Чувствительность

На основании результатов 120 исследований с 60 холостыми растворами и 60 образцами с низкой концентрацией, с 95%-ой вероятностью были определены следующие пределы обнаружения:

Предел холостого раствора (ПХ): 0.56 ЕД/мл

Предел обнаружения (ПО): 1.08 ЕД/мл

При получении значений ниже ПХ следует указывать «анализуемый образец не обнаружен». При получении значений между ПХ и ПО следует указывать «анализуемый образец обнаружен», концентрация <1.08 ЕД/мл.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариальности были проанализированы 4 образца сыворотки в 20 повторах. Для определения межсубъектной вариальности образцы измерялись дважды в ходе 20 независимых анализах. Полученные результаты приведены ниже в таблице.

Внутрисубъектная вариальность		Межсубъектная вариальность	
Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)	Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)
24.39	1.99	24.31	5.71
44.26	1.42	44.67	3.11
154.59	2.31	157.0	3.12
305.87	1.98	316.42	2.80

Линейность - тест разведения

Исследование 6 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом в соответствии с протоколом. Среднее значение восстановления после разведения составляло 92.6%. Ниже приведена формула для расчета измеренной концентрации (Y) в зависимости от ожидаемой концентрации (X), которая демонстрирует хорошую

линейность:

$$Y = 0.9899X - 4.2676 \quad R^2 = 0.9967$$

n = 20

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным уровнем CA125. Средний процент восстановления для 3 образцов сыворотки с известным количеством CA125 на каждом из 3 уровней, составил 103.37% (диапазон от 99% до 107%).

Эффект крючка

Для концентраций ниже 25000 ЕД/мл высокодозный «эффект крючка» не наблюдается.

Ожидаемые значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные интервалы эталонных значений для популяции пациентов.

Были оценены образцы сыворотки донорской крови 408 практически здоровых, небеременных женщин:

Образцы	408
Среднее значение (ЕД/мл)	16.53
Медиана (ЕД/мл)	14.03
Образцы <35 ЕД/мл	386 (94.6 %)
Образцы <55 ЕД/мл	404 (99.0 %)

Примечания к методике

- Несоблюдение требований инструкции существенно влияет на точность получаемых результатов.
- Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.
- **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки должны быть надёжно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное перемешивание может отрицательно повлиять на результаты количественного определения.

Ограничения метода

- Количественное определение CA125 не следует использовать в качестве скрининга для выявления злокачественных новообразований.
- Значения CA125 ≥ 35 ЕД/мл могут быть выявлены у здоровых людей и у пациентов с доброкачественными состояниями.
- Значения CA125 <35 ЕД/мл не указывают на отсутствие резидуального рака яичников.

- Результаты количественного определения должны интерпретироваться с учётом всех клинических данных пациента, включая анамнез заболевания, данные дополнительных исследований и других диагностических процедур.
- Образцы плазмы, забранные от пациентов, ранее получавших с диагностической или терапевтической целью мышинный иммуноглобулин, могут содержать человеческие антимышинные антитела (НАМА). Исследование образцов, полученных от таких пациентов, может сопровождаться получением ошибочных результатов.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Компоненты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуоферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (анти-НСV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Продукты животного происхождения, использованные в наборе, были получены у здоровых животных. Тем не менее с продуктами животного происхождения следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Химическая опасность


В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой

упаковке составляет 68 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Срок годности		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики <i>in vitro</i>		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал
			
	Номер партии		

Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail:

commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES CO. LTD.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: +36-1-392-2577,

Факс: +36-1-395-9247

Замечание об авторских правах

CA125™ является торговой маркой Fujirebio Diagnostics Inc (FDI). Система CA125 IRMA основана на использовании антител OC125 и M11, которые поставляются исключительно FDI и её официальными дистрибьюторами.



Обновлено: апрель 2016