

НАБОР СА15-3 [¹²⁵I] IRMA (Номер по каталогу: RK-153CT и RK-153CT50)

Набор предназначен для прямого количественного определения онкомаркера антигена СА15-3 в сыворотке человека *in vitro* в диапазоне 0-300 Ед/мл. Каждый набор содержит материал, достаточный для 100 или 50 аналитических пробирок, позволяющий построить одну калибровочную кривую и провести количественное определение 42 (RK-153CT) или 17 (RK-153CT50) неизвестных образцов в двух экземплярах.

Введение

Антиген СА15-3 является высокомолекулярным гликопротеином муцинового типа и носит название MUC-1. Этот антиген может быть выявлен с помощью двух моноклональных антител: DF3 и 115D8. Антитело DF3 было получено против очищенных экстрактов мембранных фракций, выделенных из карциномы молочной железы человека (Kufe et al., Hybridoma 1984;3(3):223-232), антитело 115D8 – против мембран глобул молочного жира человека (Hilkens et al., Prot Biol fluids 1981; 29:813-816).

Повышенный уровень СА 15-3 в сыворотке часто наблюдается при раке молочной железы, а также при других злокачественных новообразованиях (рак яичника, легкого). Некоторые доброкачественные заболевания (например, эндометриоз, воспалительные заболевания органов малого таза, гепатит) и физиологические состояния (период беременности и лактации) могут сопровождаться повышением уровня СА 15-3.

Набор СА 15-3 не предназначен для проведения скрининга. Однако, этот метод представляет существенный клинический интерес для дифференциального диагноза и прогноза рака молочной железы, для оценки эффективности лечения, для ранней диагностики рецидива после терапии первой линии и в длительном наблюдении за пациентами в ремиссии.

Принцип метода

Процедура иммунорадиометрического анализа состоит из 2 этапов. На первом этапе образец сыворотки инкубируется в пробирках, покрытых стрептавидином, содержащих меченное биотином, связанное моноклональное антитело (115D8*). Во время инкубационного периода иммунный комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок. После инкубации пробирки промываются. На втором этапе

добавляется сигнальное моноклональное антитело, меченное ¹²⁵I (DF3*) и оно связывается с эпитопом молекулы СА15-3, который отличается от распознанного связанного антитела. Это приводит к образованию комплекса связанное антитело - антиген – сигнальное антитело, также именуемого как «сэндвич».

Реакционная смесь после этого удаляется, пробирки тщательно промываются, радиоактивность измеряется с помощью гамма-счётчика. Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Незвестная концентрация СА15-3 в образцах пациентов может быть определена по калибровочной кривой, построенной на основании значений радиоактивности ряда калибраторов, содержащих известное количество СА15-3.

*Антитела Fujirebio Diagnostics Inc



Содержание набора

1. Один флакон МЕТКИ (21 мл), готовый к использованию, содержащий <math>< 980</math> кБк ¹²⁵I-анти- СА15-3 антитело в буфере с красным красителем и 0.1 % NaN₃.
2. Один флакон (21 мл) АНТИСЫВОРОТКИ, готовой к использованию, содержащий связанное антитело в буфере с синим красителем и 0.1 % NaN₃.
3. Один флакон (10 мл) РАСТВОРИТЕЛЯ (Р), содержащий лошадиную сыворотку и PBS буфер с 0.1 % NaN₃.
4. Шесть флаконов СТАНДАРТОВ S0-S5 (6 x 0,5 мл), содержащих СА15-3 в человеческой сыворотке и 0.1 % NaN₃. Концентрации стандартов указаны в прилагаемых сертификатах качества.
5. Два флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 0,5 мл) с высокой и низкой концентрацией СА15-3 в человеческой сыворотке с 0.1 % NaN₃. Концентрации контрольных сывороток указаны в прилагаемых сертификатах качества.
6. ПРОБИРКИ С ПОКРЫТИЕМ, готовые к использованию. Пробирки 12x75 мм, упакованные в пластмассовые коробки (RK-153CT: 2 коробки, 2x50 пробирок, RK-153CT50: 1 коробка, 1x50 пробирок).
7. Один флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (40 мл), содержащий 0.2 % NaN₃. См. раздел «Подготовка реактивов».

Сертификат качества, Листок-вкладыш.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

- общее лабораторное оборудование
- высокоточные микропипетки 10 мкл
- автоматические пипетки 200 мкл
- автоматические пипетки 2000 мкл или диспенсер
- горизонтальный шейкер (как минимум 600 оборотов в минуту)
- полимерная плёнка, покрывающая пробирки
- абсорбирующая ткань
- гамма-счётчик с программным обеспечением

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общими процедурами, используемыми в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (- 20 °С). Замороженные образцы должны быть полностью разморожены и тщательно перемешаны перед оценкой. Следует избегать использования гемолизированных и липемических образцов сыворотки.

Образцы с концентрацией СА15-3 свыше 300 ЕД/мл должны быть разведены растворителем и повторно оценены. Рекомендуемое разведение: 10-кратное (450 мкл Р + 50 мкл образца).

Подготовка реактивов, хранение

После вскрытия реактивы следует хранить при температуре 2-8°С. При этой температуре каждый реактив устойчив до окончания срока годности набора. Реальный срок годности указан на упаковке и в сертификате качества.

Добавьте концентрат промывочного буфера (40 мл) к дистиллированной воде (1400 мл), чтобы получить промывочный раствор (1440 мл). Приготовленный раствор хранить при температуре 2-8°С до окончания срока годности набора.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Перед использованием тщательно смешайте 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) необходимо промаркировать дополнительно 2 обычные пробирки.

2. Переместите с помощью пипеток по 10 мкл стандартов, исследуемых образцов и контролей в соответствующие промаркированные пробирки. Закрепите пробирки в штативе. Не касайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок кончиком пипетки.
3. Поместите по 200 мкл антисыворотки в каждую пробирку (кроме пробирок Т).
4. Запечатайте все пробирки полимерной пленкой. Прочно фиксируйте штатив с пробирками на пластину шейкера. Включите шейкер и установите адекватную скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (рекомендовано 600 оборотов в минуту).
5. Инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном помешивании.
6. В каждую пробирку добавьте по 2.0 мл разведённого промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок перевернув штатив.
7. Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите этап промывания еще два раза. Расположите штатив в перевернутом состоянии на фильтровальную бумагу в течение 2 минут
8. Поместите по 200 мкл метки в каждую пробирку
9. Запечатайте все пробирки полимерной пленкой. Прочно фиксируйте штатив с пробирками на пластину шейкера. Включите шейкер и установите адекватную скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (рекомендовано 600 оборотов в минуту).
10. Инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном помешивании.
11. Промойте в соответствии с пп. 6 и 7.
12. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик не менее чем на 60 секунд
13. Вычислите концентрации СА15-3 образцов как описано в разделе «Расчёт результатов» или используйте специальное программное обеспечение.

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

| Пробирки | Общее количество | Стандарт | Контроль | Образец |
|--|------------------|----------|----------|---------|
| Стандарт | | 10 | | |
| Контроль | | | 10 | |
| Образец | | | | 10 |
| Антисыворотка | | 200 | 200 | 200 |
| Перемешивайте в течение 1 часа при комнатной температуре | | | | |
| Промывочный буфер | | 2000 | 2000 | 2000 |
| Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу | | | | |
| Повторите этап промывания еще два раза | | | | |
| Метка | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Перемешивайте в течение 1 часа при комнатной температуре | | | | |
| Промывочный буфер | | 2000 | 2000 | 2000 |
| Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу | | | | |
| Повторите этап промывания еще два раза | | | | |
| Определите уровень радиоактивности (60 секунд / пробирка) | | | | |
| Рассчитайте результаты | | | | |

Расчёт результатов

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

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

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

$$S_{1-5} / C_{1-11} / M_x \text{ (срм)} - S_0 \text{ (срм)}$$

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

На полулогарифмической бумаге для каждой концентрации СА 15-3 отложите напротив соответствующие значения

В/Т (%) для каждого стандарта. При помощи полученных точек постройте калибровочную кривую.

Определите концентрацию СА15-3 неизвестных образцов с использованием калибровочной кривой. Значениями, очевидно лежащими за пределами кривой, можно пренебречь.

Рекомендуется для обработки данных использовать программное обеспечение.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

| Пробирки | Среднее (срм) | В/Т% | СА15-3 ЕД/мл |
|----------|---------------|------|--------------|
| Т | 342248 | | |
| S0 | 161 | 0.05 | |
| S1 | 6136 | 1.8 | 15 |
| S2 | 12336 | 3.6 | 30 |
| S3 | 24193 | 7.1 | 65 |
| S4 | 42404 | 12.4 | 130 |
| S5 | 76043 | 22.2 | 300 |
| СI | 10039 | 2.9 | 24.1 |
| СII | 19442 | 5.7 | 49.6 |

Рабочие характеристики

Специфичность

Использование антител в этом количественном определении гарантирует измерения, полностью специфичные для СА15-3.

Чувствительность

Пределы определения были получены на основе 120 измерений с использованием 60 образцов холостого раствора и 60 образцов с низкой концентрацией (95% вероятность).

Предел холостого раствора (ПХ): 0.24 ЕД/мл

Предел обнаружения (ПО): 1.35 ЕД/мл

Для значений ниже ПХ необходимо указать - «анализируемый образец не обнаружен». Для значений между ПХ и ПО необходимо указать - «анализируемый образец обнаружен», концентрация <1.35 ЕД/мл.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариальности были проанализированы 4 образца сыворотки в 20 повторях. Для определения межсубъектной вариальности образцы измерялись дважды в ходе 15 анализов. Полученные результаты приведены ниже в таблице.

| Внутрисубъектная вариальность | | Межсубъектная вариальность | |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Среднее значение (ЕД/мл) | Коэффициент вариации (%) | Среднее значение (ЕД/мл) | Коэффициент вариации (%) |
| 14.32 | 1.62 | 15.59 | 3.44 |
| 31.14 | 1.33 | 33.33 | 3.95 |
| 87.50 | 1.84 | 88.44 | 4.66 |
| 217.15 | 1.36 | 221.16 | 3.12 |

Линейность - тест разведения

Исследование 5 индивидуальных образцов сыворотки проводилось в серии концентрации от 200 до 300 Ед/мл, которые были 10-кратно разбавлены и оценены в соответствии с протоколом.

Результаты восстановления после разведения составили 83.9%, 85.6%, 84.1%, 92.1% и 90.6%, соответственно.

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным уровнем СА15-3. Средний процент восстановления для 5 образцов сыворотки с известным количеством СА15-3 на каждом из 3 уровней, составило 105.9 % (диапазон 104 - 108 %).

Эффект высокой дозы

Для концентраций ниже 7500 ЕД/мл эффект высокой дозы не наблюдается.

Ожидаемые значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные интервалы эталонных значений для популяции пациентов. Были оценены образцы сыворотки донорской крови практически здоровых, небеременных женщин:

| | |
|--------------------------|-------------|
| Образцы | 295 |
| Среднее значение (ЕД/мл) | 14.67 |
| Медиана (ЕД/мл) | 14.24 |
| Образцы <30 ЕД/мл | 294 (99.7%) |
| Образцы <25 ЕД/мл | 287 (97.3%) |

Сравнение методов

RK-153CT IRMA (Y) сравнивался с IBA-CIS CA15-3 IRMA (X) на 172 образцах в пределах диапазона 5-300 ЕД/мл. С помощью линейного регрессионного анализа были получены следующие результаты:

$$Y = 1.0454X + 1.675 \quad R^2 = 0.9698$$

Примечания к методике

- Невыполнение условий инструкции достоверно влияет на результаты.
- Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей
- **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки должны быть надёжно укреплены в штативе для пробирок. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или недостаточное перемешивание может отрицательно повлиять на результаты количественного определения.

Ограничения метода

- Количественное определение СА15-3 не должно использоваться в качестве скрининга для выявления рака молочной железы.
- Значения СА15-3 ≥ 30 ЕД/мл могут быть выявлены у некоторых здоровых людей и у пациентов с доброкачественными состояниями.

- Значения СА15-3 <30 ЕД/мл не исключают отсутствия резидуального рака молочной железы.
- Результаты должны интерпретироваться с учётом всех клинических данных пациента, включая историю болезни, данные дополнительных исследований и других диагностических процедур.
- Образцы плазмы, забранные от пациентов, ранее получавших с диагностической или терапевтической целью препараты, содержащие мышинные моноклональные антитела, могут содержать человеческие антимышинные антитела (НАМА). Поэтому исследование образцов, полученных от таких пациентов может сопровождаться появлением 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

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуноферментный 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. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 136 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.



Срок годности **CONTROL** Контроль



Код партии **CAL** Стандарт



Внимание, обратитесь к сопроводительным документам **CT** Пробирка с покрытием




Биологическая опасность **TRAC** Метка



См. руководство пользователя **WASHB** Промывочный буфер



Устройство для проведения диагностик in vitro  2-8°C **AS** Хранить при температуре 2-8°C



Производитель **DIL** Раствор для разведения сыворотки



Номер по каталогу **AS** Антисыворотка



Радиоактивный материал



Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

ООО «Институт изотопов»

1535 Будапешт. Pf.: 851.

Тел.: (36-1) 392-2577,

Факс: (36-1) 395-9247

Замечание об авторских правах

CA15-3® является торговой маркой Fujirebio Diagnostics Inc (FDI). Набор CA15-3 IRMA основан на использовании антител DF3 и I15D8, которые получены только у FDI и её официальных дистрибьюторов.



обновлено апрель 2016