

НАБОР СА19-9 [¹²⁵I] IRMA

(Номер по каталогу: RK-199CT и RK-199CT50)

Набор СА19-9 IRMA предназначен для прямого количественного определения *in vitro* онкомаркера антигена СА19-9 в сыворотке крови в диапазоне 0-240 Ед/мл. Каждый набор содержит материал, достаточный для 100 или 50 аналитических пробирок, позволяющий построить одну калибровочную кривую и провести количественное определение 42 (RK-199CT) или 17 (RK-199CT50) образцов в двух экземплярах.

Введение

СА19-9 представляет собой гликопротеиновый антиген с большим молекулярным весом, который ассоциирован с муцинозными опухолями. Данный антиген циркулирует в крови и может быть обнаружен в тканях. Определение указанного антигена дает дополнительную информацию при мониторинге пациентов с подтвержденным диагнозом рака поджелудочной железы, у которых при выставлении диагноза отмечался повышенный уровень СА19-9. У пациентов с отсутствием антигена группы крови Льюиса антиген СА19-9 не выявляется в крови даже при наличии злокачественного образования.

Принцип метода

Концентрация СА19-9 определяется с помощью антитела 1116NS19-9*, распознающего специфичный эпитоп. На поверхности молекулы СА19-9 в нескольких местах присутствует такой же эпитоп. Технология количественного определения предусматривает использование высокоаффинных моноклональных антител в системе иммунорадиометрического анализа (IRMA). Биотин-связанное антитело (1116NS19-9*) связывается со специфичным эпитопом молекулы СА19-9 в ходе первого 1-часового этапа реакции в шейкере для пробирок. После промывания реакционных пробирок в ходе второго 1-часового этапа инкубации в шейкере такой же эпитоп

(имеющий несколько другую пространственную структуру) распознается сигнальным антителом (1116NS19-9*), меченным ¹²⁵I. Одни и те же, но меченные различным образом антитела в ходе двух отдельных этапов реагируют с антигенами в стандартах или образцах, что приводит к формированию комплекса **связанное антитело - антиген - сигнальное антитело**, который также называется «гомо-сэндвич». Иммунокомплекс фиксируется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь удаляется, пробирки тщательно промываются, после чего производится подсчет радиоактивности в гамма-счётчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна величине радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество СА19-9, может быть определена искомая концентрация СА19-9 в образцах пациента.

Содержание набора

1. Один флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию, содержащий <980 кБк ¹²⁵I-анти-СА19-9 антитело (1116NS19-9* - см. примечание) в буфере с красным красителем и 0.1 % KathonCG в качестве консерванта.
2. Один флакон АНТИСЫВОРОТКИ (11 мл), содержащий меченный биотином анти-СА19-9 (1116NS19-9*) в буфере с синим красителем и 0.1% KathonCG в качестве консерванта. Готовый к использованию.
3. Два флакона (2,5 мл) готовой к использованию СЫВОРОТКИ ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ (S0) на основе сыворотки мышей и буферный раствор PBS-BSA с 0.1% NaN₃ в качестве консерванта. Готовый к использованию.
4. Пять флаконов готовых к использованию СТАНДАРТОВ S1-S5 (5 x 1 мл), содержащих 15-30-60-120-240 ЕД/мл СА19-9 в человеческой сыворотке с 0.1% KathonCG и NaN₃ в

качестве консерванта. Готовый к использованию.

5. Два флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ С1, С2 (1 мл), содержащие СА19-9 в человеческой сыворотке с 0.1% KathonCG и NaN₃ в качестве консерванта. Готовый к использованию.

Концентрации контрольных сывороток указаны в прилагаемых сертификатах качества.

6. ПРОБИРКИ С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. Пробирки с покрытием для проведения реакции: 12x75 мм, упакованные в пластмассовые коробки (**RK-199CT**: 2 коробки, 2x50 пробирок; **RK-199CT50**: 1 коробка, 1x50 пробирок).
7. Один флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащий 0.1% KathonCG в качестве консерванта. См. раздел «Подготовка реактивов».

Сертификат качества.

Листок-вкладыш.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками (100 мкл), автоматические пипетки (200 и 2000 мкл), 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 °С, если исследование проводится в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокого замораживания (-20°С). Замороженные образцы должны быть полностью разморожены и тщательно перемешаны перед проведением количественного определения. Следует избегать использования гемолизированных и липемических образцов сыворотки ввиду

возможности получения неточных результатов. Образцы с концентрацией СА19-9 свыше 240 ЕД/мл должны быть разведены с помощью сыворотки для разведения и оценены повторно. Рекомендуемое разведение: 10-кратное (450 мкл S0 + 50 мкл образца).

Подготовка реактивов, хранение

После вскрытия «готовые к использованию» 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.

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 1200 мл дистиллированной воды, чтобы получить 1220 мл промывочного раствора. После разведения 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 следует тщательно перемешать 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, S1-S5), контрольной сыворотки (CI, CII) и исследуемого образца (Mx). Для определения общей радиоактивности (T) можно дополнительно промаркировать 2 обычные пробирки.
2. С помощью пипетки поместите 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.
3. Поместите по 100 мкл антисыворотки в каждую пробирку.
4. 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).

5. Инкубируйте пробирки в течение 1 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании.
6. В каждую пробирку добавьте по 2.0 мл разведённого промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок, перевернув штатив. Поместите штатив в перевёрнутом состоянии на фильтровальную бумагу на 2 минуты.
7. Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 6 еще раз.
8. Поместите по 200 мкл метки в каждую пробирку.
9. 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).
10. Инкубируйте пробирки в течение 1 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании.
11. В каждую пробирку добавьте по 2.0 мл разведённого промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок, перевернув штатив. Поместите штатив в перевёрнутом состоянии на фильтровальную бумагу на 2 минуты.
12. Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 6 еще два раза.
13. Определите радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение не менее чем 60 секунд.
14. Рассчитайте концентрацию СА19-9 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 / S0		100		
Контроль			100	
Образец				100
Антисыворотка		100	100	100
Перемешивайте в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
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				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Подсчитайте радиоактивность (60 секунд/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

Дополнительный протокол

В ходе обоих этапов реакции инкубирование может проводиться в течение 30 минут. Ниже в таблице приведены типичные значения в минуту (срм) для «свежей» и «старой» метки:

метка	«старая»		«свежая»	
	60' + 60'	30' + 30'	60' + 60'	30' + 30'
T	205625	203818	383994	392467
S0	202	148	181	136
S1	929	758	1975	1570
S2	2424	1949	5374	4418
S3	5007	4139	11343	9542
S4	10711	8409	23700	19947
S5	19766	15966	46117	37960

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:

$$B/T (\%) = \frac{S_{1-5} / C_{1-11} / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте калибровочную кривую, откладывая рассчитанные значения В/Т (%) для каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации СА19-9 по другой.

С использованием калибровочной кривой определите концентрацию СА19-9 в неизвестных образцах. 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 значение срм	В/Т%	СА19-9 ЕД/мл
Т	251 744		
S0	475	0.2	
S1	1 781	0.7	
S2	3 685	1.5	
S3	7 721	3.1	
S4	15 077	6.0	
S5	29 361	11.7	
С1	4 921	2.0	39.3
СП	10 062	4.0	78.3

Рабочие характеристики

Специфичность

Использование антител в этом количественном определении гарантирует полностью специфичное определение СА19-9.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность или минимально определяемая концентрация рассчитывалась методом

интерполяции средней величины значений сыворотки для разведения плюс 2 стандартных отклонения от калибровочной кривой. Определение проводили с использованием 20 повторов сыворотки для разведения. Значение аналитической чувствительности составило 0,3 ЕД/мл при использовании свежей метки.

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): 0.94 ЕД/мл

Предел обнаружения (ПО): 1.85 ЕД/мл
При получении значений ниже ПХ следует указывать «анализируемый образец не обнаружен». При получении значений между ПХ и ПО следует указывать «анализируемый образец обнаружен», концентрация <1.85 ЕД/мл.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариабельности было выполнено количественное определение 3 образцов сыворотки в 20 повторах. Для определения межсубъектной вариабельности измерения выполнялись дважды в 65 независимых количественных определениях. Полученные результаты представлены ниже в таблице.

Внутрисубъектная вариабельность		Межсубъектная вариабельность	
Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)	Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)
2.15	8.5	2.15	15.6
36.5	6.1	35.7	6.2
216.4	2.0	194.3	5.4

Линейность - тест разведения

Исследование 5 образцов проводилось в серии разведений с нулевым стандартом в соответствии с протоколом. Среднее значение восстановления после разведения составляло 108.0%. Ниже приведена формула для расчета измеренной концентрации (X) в зависимости от ожидаемой концентрации (Y), которая демонстрирует хорошую линейность:

$$Y = 0.9723X - 1.57 \quad R^2 = 0.9963$$

n = 15

Восстановление

Под восстановлением понималось измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным количеством СА19-9. Средний процент восстановления для 6 образцов сыворотки с известным количеством СА19-9 на каждом из 3 уровней составил 94.4% (диапазон от 86,7% до 101,1%).

Эффект крючка

Для концентраций ниже 1500000 ЕД/мл высокодозный «эффект крючка» не наблюдается.

ЭТАЛОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ и распределение значений

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

ЭТАЛОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ: 37 ЕД/мл

Были оценены образцы сыворотки донорской крови 494 практически здоровых лиц:

Образцы	494
Образцы с 0 ЕД/мл	39
Среднее значение (ЕД/мл)	4.87
Медиана (ЕД/мл)	3.22
Образцы <37 ЕД/мл	493

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 для пробирок. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или недостаточное перемешивание может отрицательно повлиять на результаты количественного определения.

Ограничения метода

- Количественное определение СА19-9 не должно использоваться в качестве скрининга для выявления злокачественных новообразований.
- Значения СА19-9 ≥ 37 ЕД/мл могут быть выявлены у некоторых здоровых людей и у пациентов с доброкачественными состояниями.
- Результаты количественного определения должны интерпретироваться с учётом всех клинических данных пациента, включая анамнез заболевания, результаты 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

Препараты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были индивидуально протестированы с использованием утвержденных методов (ИФА, 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 KathonCG. Содержание KathonCG в каждой упаковке составляет 64 мг. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 12 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

Коммерческий e-mail:
commerce@izotop.hu



ООО «Институт изотопов»
H-1121 Budapest, Konkoly-Thege Miklós út 29-33

H-1535 Будапешт. Р.О.В. 851. Венгрия

Тел.: +36 1 3959081

Факс: +36 1 3959274

Примечание

*СА19-9™ является торговой маркой Fujirebio Diagnostics Inc (FDI). Набор СА19-9 IRMA основан на использовании антител 1116NS19-9.



Обновлено: декабрь 2018



Срок годности **CONTROL** Контроль



Номер партии **CAL** Стандарт



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



Биологическая опасность **TRAC** Метка



Обратитесь к инструкции по использованию **WASHB** Промывочный буфер



Номер по каталогу **AS** Антисыворотка



Устройство для проведения диагностики *in vitro* **8°C** Температурный предел. Хранить при температуре 2-8°C



Производитель  Радиоактивный материал



Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail:
immuno@izotop.hu