

Набор чКЭА [I-125] IRMA (Номер по каталогу: RK-38CT)

Система ¹²⁵I-чКЭА IRMA позволяет проводить прямое количественное определение человеческого канцероэмбрионального антигена (чКЭА) *in vitro* в сыворотке крови человека в диапазоне от 0-180 нг/мл. Каждый набор содержит количество материалов достаточное для анализа 100 пробирок, позволяя составить одну стандартную кривую и проанализировать 41 неизвестный образец в двух экземплярах.

Введение

Канцероэмбриональный антиген (КЭА) представляет собой поверхностный гликопротеин с молекулярной массой 180-200 кДа. Он обнаруживается в высокой концентрации в эпителиальных клетках кишечника во время эмбрионального развития. Уровень КЭА значительно ниже в тканях кишечника взрослых, но его уровень может повышаться при воспалительных, либо опухолевых процессах в любой эндодермальной ткани, включая желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути, поджелудочную и молочную железы.

Повышенная экспрессия КЭА может иметь место при аденокарциномах различной локализации: желудок, тонкий и толстый кишечник, прямая кишка, яичники, молочная железа, шейка матки, а также при мелкоклеточном раке легких. КЭА так же экспрессируется эпителиальными клетками при различных незлокачественных заболеваниях, включая дивертикулит, панкреатит, воспалительные заболевания кишечника, цирроз, гепатит, бронхит, почечная недостаточность, а также у сильно курящих людей.

Таким образом, КЭА не может быть использован как опухолеспецифический маркер для скрининга общей популяции для выявления рака. Однако определение уровня КЭА антигена дает важную информацию о прогнозе течения заболевания, возникновении рецидивов после хирургической операции и эффективности терапии.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA) подразумевает использование двух высокоафинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченое ¹²⁵I, связано с эпитопом молекулы КЭА, которая пространственно отличается от молекулы, обнаруживаемой биотин-иммобилизованным антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса **иммобилизованное антитело –**

антиген – сигнальное антитело, также известного как "сэндвич".

В течение 1 часового инкубационного периода при постоянном перемешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакцию смесь извлекают, пробирки тщательно промываются и после этого измеряют радиоактивность в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем нанесения значений связывания, соответствующих стандартам, содержащим известное количество чКЭА, строится калибровочная кривая, с помощью которой можно определить концентрацию чКЭА в клиническом образце.

Содержание набора

- 1 флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию. Содержит около 740 кБк ¹²⁵I-анти-чКЭА и захватывающего анти-чКЭА в буфере с красным красителем 0,1% NaN₃.
- 7 флаконов СТАНДАРТОВ (7 по 1 мл), готовых к использованию, содержащих приблизительно 0, 1,6*, 3, 10, 30, 90, 180 нг/мл чКЭА (ВОЗ 1st IS 73/601 Int.Std.) в сыворотке крови человека с 0,1% NaN₃. **(*более точная концентрация указана на этикетке).**
- 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 1 мл), низкая (С1) и высокая (СII). Сыворотка крови человека, содержащая 0,1% NaN₃. Готовая к использованию. Концентрации контрольных сывороток указаны в прилагаемых сертификатах качества.
- 1 флакон РАСТВОРА ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ ОБРАЗЦОВ (5 мл), готовый к использованию. Подготовлен в лошадиной сыворотке.
- 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирки, 12 x 75 мм, упакованные в пластиковые коробки.
- 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащего 0,2% NaN₃. *Смотрите «Приготовление реактивов».* Сертификат качества Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками (50, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой смеситель, шейкер, полиэтиленовая пленка, адсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование:

Градуированные пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с 1-литровым резервуаром (вместо 2-мл пипетки).

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы можно хранить при температуре 2-8 °C в случае, если анализ будет проводиться в течение 24 часов, иначе аликвоты должны быть сохранены в условиях глубокого замораживания (-20 °C). Перед анализом образцы необходимо разморозить и тщательно перемешать. Не следует использовать гемолизированные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.

Образцы с концентрацией чКЭА более 180 нг/мл должны быть разбавлены раствором для разведения и заново проанализированы. Рекомендуемое разведение: 10-кратное (450 мкл раствора для разведения + 50 мл образца).

Приготовление и хранение реактивов

Хранить реактивы после вскрытия следует при температуре от 2 °C до 8 °C. При такой температуре реактив стабилен до истечения срока годности набора. Фактический срок указан на этикетке и в сертификате качества.

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды, чтобы получить 720 мл промывочного раствора. Разбавленный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C до истечения срока годности набора.

ВНИМАНИЕ!

Уравновесьте все реактивы и образцы сыворотки при комнатной температуре. Перед использованием тщательно перемешайте все реактивы и образцы. Избегайте чрезмерного пенообразования

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реагенты и образцы при комнатной температуре.
2. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца. При желании промаркируйте две пробирки для подсчета общей радиоактивности (Т).
3. Аккуратным перемешиванием гомогенизируйте все реактивы и образцы, избегая вспенивания.
4. С помощью пипетки поместите 50 мкл содержимого каждого стандарта, контрольной сыворотки и образцов в предварительно промаркированные пробирки. Для поддержания пробирок используйте штатив. Не трогайте и не царапайте наконечником пипетки внутреннюю поверхность дна пробирок.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 200 мкл метки.
6. Закройте все пробирки полиэтиленовой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и настройте скорость, подходящую для того, чтобы

жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась (рекомендуемая скорость 600 об/мин).
 7. Помешивайте пробирки в течение 1 часа при комнатной температуре.
 8. Добавьте в каждую пробирку по 2,0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив на фильтровальную бумагу в перевернутом состоянии на 2 минуты.
 9. Верните штатив в первоначальное положение и повторите этап 8 еще один раз.
 10) Рассчитайте радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение как минимум 60 секунд.
 11. Рассчитайте концентрацию КЭА в образце, как это описано в пункте «Расчет результатов» или с помощью специального программного обеспечения.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения с помощью пипетки (все объемы представлены в микролитрах)

Пробирки	Всего	Стандарт	Контрольный образец	Образец
Стандарт		50		
Контрольный образец			50	
Образец				50
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Измерьте уровень радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

Расчет результатов

Расчет результатов проиллюстрирован с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.
 Рассчитайте среднее значение в минуту (срм) для каждой из пар анализируемых пробирок.
 Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого из стандарта, контроля и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$V/T(\%) = \frac{S_{1-6} / C_{1-П} / M_x (\text{срм}) - S_0 (\text{срм})}{T(\text{срм})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график В/Т (%) для каждого стандарта относительно соответствующей концентрации КЭА.

Определите концентрацию КЭА в неизвестном образце методом интерполяции по калибровочной кривой. Не следует экстраполировать значения, лежащие вне диапазона концентраций калибровочной кривой.
 Для автоматической обработки полученных данных можно использовать логит-преобразование или сплайн подбор. Так же доступна автоматизированная система обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	чКЭА нг/мл	Число срм	Среднее срм	В/Т%
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

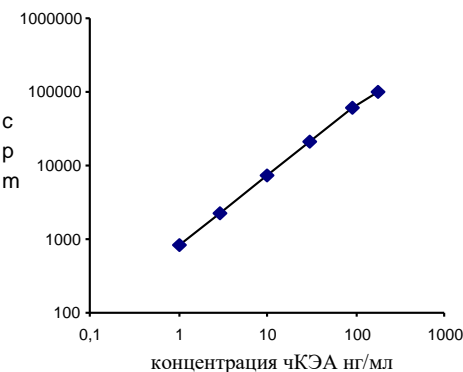


Рисунок 1. Типичная калибровочная кривая (не используйте для расчетов результатов количественного определения!)

Характеристика количественного определения

Специфичность

При нормальном физиологическом уровне не выявляется перекрестной реактивности с NCA.

Чувствительность

Аналитическая чувствительность или минимально определяемая концентрация рассчитывалась методом интерполяции средней величины значений нулевого стандарта плюс 2 стандартных отклонения от калибровочной кривой. Определение проводили с использованием 15 повторов нулевого стандарта.
 Значение аналитической чувствительности составило 0,01 нг/мл при использовании свежей метки и 0,05

нг/мл при использовании метки, хранившейся 4 недели.
 Функциональная чувствительность представляет собой определение концентрации чКЭА, значительно отличающейся от нуля, как это определено при анализе межсубъектной вариабельности (значение CV 22%).
 Значение функциональной чувствительности составило: < 0.4 нг/мл.
 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): 0.035 нг/мл
 Предел обнаружения (ПО): 0.09 нг/мл

Точность

Для определения точности в ходе определения внутрисубъектной вариабельности были проанализированы 5 контрольных партий образцов в 10 повторах. Полученные значения приведены ниже:

Образец	Количество повторов	Среднее значение нг/мл	CO, нг/мл	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

Воспроизводимость

Для определения точности при определении межсубъектной вариабельности были протестированы 5 контрольных партий образцов дважды, в 15 независимых анализах, выполненных 3 исполнителями при использовании наборов различных партий. Полученные значения приведены ниже.

Образец	Количество анализов	Среднее значение нг/мл	CO, нг/мл	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

Линейность – тест на разведение

Индивидуальные образцы сыворотки крови пациентов были разбавлены раствором для разведения образцов набора. Разведенные образцы были протестированы согласно протоколу набора. Полученные результаты находились в диапазоне от 97,6% до 108%.

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение ожидаемого повышения пиков образцов сыворотки в процентном выражении при известном количестве чКЭА. Средний уровень восстановления для 5 партий сывороток с

чКЭА на 3 уровнях был следующим: 99,4 ± 5,2%, с диапазоном от 90% до 108%.

Ожидаемые значения

У 95% здоровых людей уровень КЭА обычно составляет < 3.0 нг/мл.

У курящих людей уровень нормальным считается уровень КЭА < 5.0 нг/мл.

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

Полученные результаты должны быть интерпретированы только в соответствии с общей клинической картиной. Ни один из диагностических наборов не может быть использован в качестве единственного доказательства наличия какого-либо заболевания или нарушения.

Эффект крючка

Для концентраций ниже 15000 нг/мл высокодозный «эффект крючка» не наблюдается.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Пробирки для проведения реакции упакованы в пластиковые коробки и не промаркированы индивидуально. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перепутать их с обычными пробирками. Для минимизации риска ошибки не берите из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо. Неиспользованные пробирки, оставшиеся после работы, положите обратно в коробку. Пробирки, используемые для анализа, рекомендуется пометить маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки следует плотно установить на штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

Ограничения

Реактивы, предоставленные в данном наборе, оптимизированы для измерения чКЭА в сыворотке крови.

Следует избегать повторного замораживания и размораживания реактивов и образцов.

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, относящихся к порядку использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были индивидуально протестированы с

использованием утвержденных методов (иммуоферментный анализ), и были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (анти-НСV), антитрепонемных антител поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при обращении с человеческими образцами, которые должны быть протестированы диагностическими наборами. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека всегда стоит обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Все продукты животного происхождения и их производные были получены у здоровых животных. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

Компоненты бычьего происхождения были получены в странах, где не зарегистрированы случаи развития губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. Тем не менее вещества животного происхождения должны рассцениваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

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 74 мг.

Условия хранения и срок годности

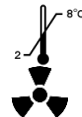
Хранить при температуре 2-8°C
Срок годности: 60 дней с момента готовности.



Производитель

REF

Номер по каталогу



Хранить при температуре 2-8°C

Радиоактивный материал



Сайт: <http://www.izotop.hu>
Технический e-mail: immuno@izotop.hu
Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



ООО «Институт изотопов»
1535 Будапешт. Pф.: 851.
Тел.: (36-1) 392-2577,
Факс: (36-1) 395-9247

Обновлено: октябрь 2021 г.



Срок годности

CONTROL

Контроль



Номер партии
Внимание, обратитесь к

CAL

Стандарт



сопроводит ельным документам Биологическая опасность
Обратитесь к

CT

Пробирка с покрытием



инструкции по использованию

TRAC

Метка



Устройство для проведения диагностик и in vitro

WASHB

Промывочный буфер



DIL

Раствор для разведения сыворотки