

НАБОР СА72-4 [I] IRMA (Номер по каталогу: RK-724CT и RK-724CT50)

Набор СА72-4 IRMA предназначен для прямого количественного определения антигена TAG-72 (гликопротеин 72, ассоциированный с опухолями) в сыворотке человека *in vitro* в диапазоне 3-100 Ед/мл. Каждый набор содержит материал, достаточный для 100 или 50 аналитических пробирок, позволяющий построить одну калибровочную кривую и провести количественное определение 44 (RK-724CT) или 19 (RK-724CT50) неизвестных образцов в двух экземплярах.

Введение

TAG-72 (также называемый СА72-4) представляет собой высокомолекулярный гликопротеиновый антиген, ассоциированный с муцинозными опухолями, который преимущественно выделяется злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта. TAG-72 был первоначально выделен с помощью мышиного моноклонального антитела В72.3, полученного после иммунизации обогащенной фракцией метастатической карциномы молочной железы (Colcher et al, 1981). Очищенный антиген был использован для разработки следующего поколения моноклональных антител, из которых СС49 был выделен для проведения двойного иммуноанализа (Gero et al, 1989). Оба антитела связываются с различными олигосахаридными эпитопами молекулы TAG-72.

Данный набор для количественного определения использовался в различных клинических испытаниях, которые показали его хорошую чувствительность и специфичность при раке желудка. Повышенный уровень TAG-72 в плазме также наблюдается у пациентов с раком яичников, поджелудочной железы, толстой кишки, желчного пузыря, молочной железы, шейки матки и эндометрия. Маркер СА 72-4 является средством выбора для мониторинга лечения и наблюдения за пациентами с раком желудка.

Принцип метода

Технология предусматривает использование двух высокоаффинных моноклональных антител в системе иммунорадио-метрического анализа (IRMA). Методика количественного определения основана на 2-этапной процедуре. На первом этапе образец сыворотки инкубируется в пробирке, покрытые стрептавидином, содержащих меченное биотином, связанное моноклональное антитело (СС49*). В

течение инкубационного периода при постоянном помешивании иммунокомплекс иммобилизуется на реактивную поверхность пробирок. После инкубационного периода пробирки промываются.

На втором этапе добавляется меченое ¹²⁵I сигнальное моноклональное антитело (В72.3*) и оно связывается с эпитопом молекулы СА72-4, который отличается от распознанного связанного антитела. Это приводит к образованию комплекса связанное антитело - антиген – сигнальное антитело, также именуемое как «сэндвич».

Реакционная смесь после этого удаляется, пробирки тщательно промываются, радиоактивность измеряется с помощью гамма-счётчика.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Неизвестная концентрация СА72-4 в образцах пациентов может быть определена по калибровочной кривой, построенной на основании значений радиоактивности ряда калибраторов, содержащих известное количество СА72-4.

*Антитела Fujirebio Diagnostics Inc



Содержание набора

1. Один флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию, содержащий 980 кБк ¹²⁵I-В72.3 антитело в буфере с красным красителем и 0.1 % NaN₃.
2. Один флакон АНТИСЫВОРОТКИ (11 мл), готовой к использованию, содержащий биотинированное антитело СС49 в буфере с синим красителем и 0.1% NaN₃.
3. Один флакон (5 мл) РАСТВОРИТЕЛЯ на основе сыворотки лошадей и PBS буфер с 0.1% NaN₃.
4. Четыре флакона СТАНДАРТОВ S1-S4 (4 x 1 мл), содержащих 3-20-50-100 ЕД/мл СА72-4 в человеческой сыворотке с 0.1% NaN₃. Концентрации стандартов указаны в прилагаемых сертификатах качества. Калибровка количественного определения проводится с помощью набора СА72-4RIA компании Fujirebio Diagnostics Inc.
5. Два флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ С1, С2 (2 x 1 мл), содержащие низко-положительные и высоко-положительные концентрации СА72-4 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-724CT: 2 коробки, 2x50 пробирок, RK-724CT50: 1 коробка, 1x50 пробирок).

7. Один флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВНОГО БУФЕРА (40 мл), содержащий 0.2% NaN₃. См. раздел «Подготовка реактивов».

Сертификат качества.

Листок-вкладыш.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками (100, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, шейкер, полимерная плёнка, покрывающая пробирки, абсорбирующая ткань, гамма-счётчик с программным обеспечением.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Пипетки для дозирования растворов (Eppendorf или др.), диспенсер с резервуаром 1,5 литра (вместо пипетки 2 мл).

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 СА72-4 свыше 100 ЕД/мл должны быть разведены с помощью Растворителя (Р) 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. Срок годности указан на упаковке и в сертификате качества.

Добавьте концентрат промывочного буфера (40 мл) к 1400 мл дистиллированной воды, чтобы получить 1440 мл промывочного раствора. 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 (S1-S4), контрольной сыворотки и исследуемого образца. Для определения общей радиоактивности (Т) необходимо промаркировать дополнительно 2 обычные пробирки.
2. Переместите с помощью пипеток по 100 мкл стандартов, исследуемых образцов и контролей в соответствующие 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 (за исключением 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 (мин. 600 оборотов в минуту).
5. Инкубируйте в течение 2 часов 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. Инкубируйте в течение 18-22 часов при температуре 2-8 °С.
10. Повторите шаг 6 и 7.
11. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик не менее чем на 60 секунд
12. Вычислите концентрации СА72-4 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		100		
Контроль			100	
Образец				100
Антисыворотка		100	100	100
Перемешивайте в течение 2 часов при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Повторите процедуру промывания еще 2 раза				
Метка	200	200	200	200
Инкубируйте в течение 18-22 часов при температуре 2-8 °С				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Повторите процедуру промывания еще 2 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:

$$S_{1-4} / C_{1-11} / M_x \text{ (CPM)}$$

$$B/T \text{ (\%)} = \frac{\text{Среднее значение}}{T \text{ (CPM)}} \times 100$$

На полулогарифмической бумаге для каждой концентрации СА72-4 отложите напротив соответствующие значения В/Т (%) для каждого стандарта. При помощи полученных точек постройте калибровочную кривую.

Определите концентрацию СА72-4 неизвестных образцов с использованием калибровочной кривой. Значениями, очевидно лежащими за пределами кривой, можно пренебречь.

Для автоматической обработки полученных данных рекомендуется использовать аппроксимацию с помощью сплайн-

функций.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Среднее значение СРМ	В/Т %	СА72-4 ЕД/мл
T	248108		
S1	751	0.3	2
S2	7683	3.1	18
S3	21467	8.7	50
S4	40768	16.4	100
CI	1935	0.8	4.7
СИ	25248	10.2	59.4

Рабочие характеристики

Специфичность

Использование антител в этом количественном определении гарантирует измерения, полностью специфичные для СА72-4.

Предел обнаружения

На основании результатов 120 исследований с 60 холостыми растворами и 20 растворами с низкой концентрацией (менее 3 ЕД/мл) трехкратно с 95% вероятностью установлен Предел обнаружения = 1,94 ЕД/мл.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариальности были проанализированы 4 образца сыворотки в 20 повторах. Для определения межсубъектной вариальности образцы были измерены дважды в ходе 22 независимых анализах. Полученные результаты показаны ниже.

Внутрисубъектная вариальность		Межсубъектная вариальность	
Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)	Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)
3.4	1.06	3.27	6.32
9.83	2.12	9.65	5.78
30.66	1.89	27.98	6.94
86.41	5.03	79.01	5.77

Линейность - тест разведения

4 индивидуальных образца сыворотки были 10-кратно разведены с помощью растворителя и проанализированы в соответствии с протоколом.

Образцы	1	2	3	4
СА72-4 ЕД/мл	71.6 7	72.7 8	56.3 3	76.6
Разведение	9.76	9.76	9.78	9.76
Ожидаемое значение ЕД/мл	7.34	7.45	5.76	7.85

Измеренное значение ЕД/мл	7.81	7.67	5.64	8.01
Измеренное / Ожидаемое (%)	106.4	102.9	97.9	102.1

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиковых значений в образцах сыворотки с известным уровнем СА72-4. Средний процент восстановления для 5 образцов сыворотки с известным количеством СА72-4 на каждом из 3 уровней, составило 101.44 % (диапазон 91% - 117%).

Эффект высокой дозы

Для концентраций ниже 1100 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 300 практически здоровых лиц (150 мужчин и 150 женщин):

Медиана (ЕД/мл)	1.47
Среднее значение (ЕД/мл)	1.77
Стандартное отклонение (ЕД/мл)	1.94
Образцы <4 ЕД/мл	285 (95.0%)

Сравнение методов

СА72-4 IRMA (Y) сравнивался с Fujirebio Fujirebio Diagnostics Inc. СА72-4 RIA (X) на 68 образцах в пределах диапазона 2-100 ЕД/мл. С помощью линейного регрессионного анализа были получены следующие результаты:

$$Y = 1.087X - 0.1828 \quad R^2 = 0.9259$$

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!** Пробирки для проведения реакции, упакованные в пластмассовых коробках, индивидуально не маркированы. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перепутать их с обычными пробирками. Для минимизации риска никогда не берите из пластмассовой коробки больше пробирок, чем это необходимо, после работы помещайте оставшиеся пробирки назад в коробку. Рекомендуется маркировать пробирки для количественного определения с

помощью маркера.

- **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки должны быть надёжно укреплены в штативе для пробирок. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерная или недостаточная вибрация может отрицательно повлиять на результаты количественного определения.

Ограничения метода

- Количественное определение СА72-4 не должно использоваться в качестве скрининга для выявления злокачественного новообразования.
- Значения СА72-4 ≥ 4 ЕД/мл могут быть выявлены у некоторых здоровых людей и у пациентов с доброкачественными состояниями.
- Значения СА72-4 менее 4 ЕД/мл не свидетельствуют об отсутствии резидуальных опухолей.
- 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 (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. Азид, входящий в состав реактивов, может реагировать с частицами свинца и меди, находящимися в водопроводной системе с образованием высоко взрывоопасных азидов металлов. При утилизации компонентов набора необходимо смывать их большим количеством воды для предотвращения накопления азидов в водопроводной системе. Содержание азиды натрия в каждой упаковке составляет 123 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



Пробирка с покрытием **CT**



Биологическая опасность **TRAC** Метка



См. руководство о пользовании **WASHB** Промывочный буфер



Устройство для проведения диагностик и in vitro **AS** Антисыворотка



Производитель **DIL** Раствор для разведения сыворотки



Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C




Устройство для проведения диагностик и in vitro **AS** Антисыворотка



Производитель **DIL** Раствор для разведения сыворотки




Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C




Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C



Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C



Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C



Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C



Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C



Номер по каталогу **REF**  2-8°C Хранить при температуре 2-8°C



Радиоактив
ный
материал



Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

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 1 392-2577

Факс: +36 1 395-9247

Примечание

CA72-4 TM является торговой маркой Fujirebio Diagnostics Inc (FDI). Набор CA72-4 IRMA основан на использовании антител В72.3 и СС49, которые доступны только у компании FDI и ее официальных дистрибьюторов.



обновлено апрель 2016