

## Informace o výrobku

Informace o ostatních produktech jsou dostupné na [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

## Návod k použití

# CA125 IRMA

Souprava CA125 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení s tumorem asociovaného antigenu CA125 v lidském séru

## 1. Popis

Souprava CA125 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení s tumorem asociovaného antigenu CA125 v lidském séru v rozmezí 0-500 U/ml. Každá souprava obsahuje materiál dostatečný pro měření 100 zkumavek, umožňující sestavení jedné kalibrační křivky a stanovení 42 neznámých vzorků v duplikátech.

## 2. Úvod

CA125 je antigen coelomového epitelu navázaný na vysokomolekulární glykoproteinový komplex (200 – 1000 kDa). Tento antigen byl poprvé definován monoklonální protilátkou OC125, která byla získána imunizací myši buněčnou linií OVCA 433, pocházející ze serosního papilárního cystadenokarcinomu ovárií (Bast et al., J Clin Invest 68:1331-1337, 1981).

CA125 se vyskytuje u většiny epiteliálních ovariálních karcinomů, především nemucinového typu. Vysoké hladiny v séru se vyskytují hlavně u karcinomu ovárií, ale mohou být v menší míře pozorovány i u jiných nádorů (prsa, střevo, plíce, pankreas, děloha a játra), nebo u nemaligních stavů jako je endometrios, pericarditida, cirhosa, menstruace a první trimestr těhotenství.

Stanovení CA125 není vhodné jako screeningový test, má však velký klinický význam pro diferenciální diagnostiku ovariálního karcinomu, zhodnocení účinnosti léčby, včasnou detekci relapsu po léčbě první linie a dlouhodobé sledování pacientů v remisi.

## 3. Princip metody

V technologii imunoradiometrického stanovení (IRMA) jsou využity dvě monoklonální protilátky s vysokou afinitou. Signální protilátka (OC125\*) značená  $^{125}\text{I}$  se váže na epitop molekuly CA125, který se prostorově liší od epitopu rozpoznávaného biotinylovanou vychytávající („capture“) protilátkou (M11\*). Tyto dvě protilátky současně reagují s antigenem ve vzorku nebo kalibrátoru, což vede ke vzniku komplexu **vychytávající protilátka-antigen-signální protilátka** (tzv. sandwich).

Během třepání v průběhu dvouhodinové inkubace je imunokomplex imobilizován na reaktivním povrchu zkumavek potaženým streptavidinem. Reakční směs je poté slita a po dostatečném promytí zkumavek je gama-čítačem změřena radioaktivita.

Koncentrace antigenu je přímo úměrná radioaktivitě změřené ve zkumavkách. Pomocí kalibrační křivky, kdy je vynášena vázaná radioaktivita proti řadě kalibrátorů obsahujících známé množství CA125, je stanovena neznámá koncentrace CA125 ve vzorcích pacientů.

*\*protilátka Fujirebio Diagnostics Inc.*

## 4. Obsah soupravy

1. Jedna lahvička „TRACER“ (11 ml), připraveno k použití, radioindikátor obsahující značenou protilátku  $^{125}\text{I}$ -anti-CA125 (<980 kBq) a biotinylovanou „capture“ protilátku v pufru s červeným barvivem a 0,1 %  $\text{NaN}_3$ .
2. Jedna lahvička (5ml) „STANDARD ZERO“ (S0), nulový kalibrátor v koňském séru s 0,1 %  $\text{NaN}_3$ .
3. Pět lahviček „STANDARD S1-S5“ (5x 1ml), kalibrátory S1-S5 obsahující 15-30-80-200-500 U/ml CA125 v lidském séru s 0,1 %  $\text{NaN}_3$ . Kalibrace byla provedena metodou CA125II RIA Fujirebio Diagnostics Inc.
4. Dvě lahvičky „CONTROL SERUM“ (1 ml), kontrolní séra obsahující přibližně 50 U/ml a 100 U/ml CA125 v lidském séru s 0,1 %  $\text{NaN}_3$ . Koncentrace kontrolních sér jsou uvedeny v příloženém certifikátu kvality.
5. Dvě krabičky „COATED TUBES“, potažené zkumavky, připravené k použití: 2x50 reagenčních zkumavek, 12x75 mm, zabalených v plastových krabičkách.

6. Jedna lahvička „WASH BUFFER CONCENTRATE“ (20 ml), koncentrát promývacího pufru, obsahující 0,1 %  $\text{NaN}_3$ . *Viz příprava reagensí.*
7. Certifikát kvality
8. Příbalový leták

## 5. Potřebný materiál, pomůcky a vybavení

- běžné laboratorní vybavení
- mikropipeta na 100  $\mu\text{l}$
- opakovací pipeta na 100  $\mu\text{l}$
- opakovací pipeta nebo dávkovač na 2000  $\mu\text{l}$
- horizontální třepačka (alespoň 600 rpm)
- plastická folie na překrytí zkumavek
- savá buničina (papír)
- gama-čítač se softwarem

## 6. Odběr vzorků a jejich skladování

Vzorky sér mohou být připraveny obvyklým postupem používaným rutinně v klinické laboratorní praxi. Vzorky mohou být skladovány při 2-8 °C, pokud je jejich analýza provedena během 24 hodin, v opačném případě by měly být připravené alikvoty vzorků skladovány hluboce zmrazené (-20 °C). Zmrazené vzorky musí být před analýzou rozmrazeny a řádně rozmíchány. Hemolyzované a lipemické vzorky by neměly být používány, protože mohou poskytovat chybné výsledky.

*Vzorky obsahující CA125 o koncentraci vyšší než 500 U/ml by měly být zředěny nulovým kalibrátorem S0 a znovu analyzovány. Doporučené ředění: 10krát (450  $\mu\text{l}$  S0 + 50  $\mu\text{l}$  vzorku).*

## 7. Příprava reagensí, skladování

Reagencie skladujte po otevření při 2-8 °C. Při této teplotě jsou reagencie stálé až do data expirace soupravy. Datum expirace je uvedeno na obalu a na certifikátu kvality. Přidejte koncentrát promývacího pufru „WASH BUFFER CONCENTRATE“ (20ml) do 700 ml destilované vody pro přípravu 720 ml promývacího roztoku. Po zředění uchovávejte při 2-8 °C až do data expirace soupravy.

### POZOR!

Vytemperujte všechny reagencie a vzorky sér na pokojovou teplotu. Před použitím všechny reagencie a vzorky důkladně promíchejte. Zamezte nadměrnému vzniku pěny.

## 8. Postup stanovení

(Zkrácený návod viz tabulka 1)

1. Popište potažené zkumavky v duplikátech pro každý kalibrátor (S0-S5), kontrolní sérum a vzorek. Můžete popsat dvě zkumavky na změření celkové aktivity (T – Total).
2. Napipetujte **100  $\mu\text{l}$**  kalibrátorů, kontrolních sér a vzorků do řádně označených zkumavek. Použijte stojánek k uložení zkumavek. Špičkou pipety se nedotýkejte ani nepoškrábejte vnitřní dno zkumavek.
3. Napipetujte **100  $\mu\text{l}$**  „TRACER“ do každé zkumavky.
4. Uzavřete všechny zkumavky plastovou folií. Pevně připevněte stojánek se zkumavkami na třepačku, zapněte ji a nastavte takovou rychlost, aby se tekutina v každé zkumavce nepřetržitě protřepávala nebo otáčela (doporučuje se min. 600 rpm)
5. Za protřepávání nechte zkumavky inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě.

6. Do každé zkumavky přidejte **2,0 ml** zředěného promývacího pufru\*. Vylijte obsah všech zkumavek obrácením stojánku vzhůru nohama. V této pozici nechejte stojánek stát na savém papíru po dobu alespoň 2 minut.
7. Obraťte stojánek zpět do normální polohy a dvakrát zopakujte promývací krok.
8. Proměřte každou zkumavku gama-čítačem po dobu alespoň 60 sekund.
9. Vypočtěte koncentrace CA125 ve vzorcích podle níže uvedeného postupu (9. Výpočet výsledků), nebo použijte speciální software.

\*Při použití automatického analyzátoru (Stratec apod.) lze k promývání použít pouze destilovanou vodu, doporučuje se však přidat jeden promývací krok navíc.

Tabulka 1: Pracovní protokol, návod na pipetování (všechny objemy jsou uvedeny v mikrolitrech)

Zkumavky	Total	Kalibrátor	Kontrola	Vzorek
Kalibrátor		100		
Kontrolní sérum			100	
Vzorek				100
Radioindikátor	100	100	100	100
Protřepávejte 2 hod při pokojové teplotě				
Promývací pufr		2000	2000	2000
Slijte tekutinu a nechejte odkapat na savém papíru				
Promývací pufr		2000	2000	2000
Slijte tekutinu a nechejte odkapat na savém papíru				
Promývací pufr		2000	2000	2000
Slijte tekutinu a nechejte odkapat na savém papíru				
Změřte radioaktivitu (60 sekund/zkumavka)				
Vypočtěte výsledky				

## 9. Výpočet výsledků

Výpočet je vysvětlen na reprezentativních datech. Změřená data by měla být podobná těm, která jsou uvedena v tabulce 2. Vypočtěte průměrný počet impulsů za minutu (cpm) pro každý pár zkumavek. Pomocí následujícího vzorce vypočtěte normalizovanou vazbu v procentech pro každý kalibrátor, kontrolní sérum resp. vzorek:

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

Na semilogaritmicím papíru vyneste B/T(%) pro každý kalibrátor proti odpovídající koncentraci CA125. Stanovte koncentraci CA125 v neznámých vzorcích interpolací kalibrační křivky. Neextrapolujte hodnoty mimo rozsah kalibrační křivky. Při hodnocení pomocí výpočetní techniky je doporučováno použití spline-funkce.

Tabulka 2: Typická data měření:

Zkumavky	Průměr cpm	B/T(%)	CA125 U/ml
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
CII	10973	3,8	105,9

## 10. Validační parametry metody

### Specifičnost

Protilátky použité v této metodě zajišťují naprosto specifickou detekci CA125.

### Citlivost

Na základě 120 stanovení (60 slepých vzorků a 60 vzorků s nízkým obsahem analytu) byly s 95% pravděpodobností stanoveny následující limity měření:

Mez slepého pokusu (Limit of blank LoB): 0,56 U/ml

Mez detekce (Limit of detection LoD): 1,08 U/ml

Výsledky pod hodnotou LoB by měly být vydávány jako “analyt nedetekován”. Výsledky mezi hodnotami LoB a LoD by měly být vydávány jako “analyt detekován”, koncentrace <1,08 U/ml.

### Preciznost a reprodukovatelnost

Čtyři směsi séra byly změřeny ve 20 replikátech za účelem stanovení preciznosti v sérii. Pro stanovení preciznosti mezi sériemi byly vzorky měřeny v duplikátech v 20 nezávislých stanoveních. Výsledky jsou uvedeny níže:

V sérii		Mezi sériemi	
Průměr (U/ml)	CV %	Průměr (U/ml)	CV %
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

### Linearita - diluční pokus

Šest jednotlivých vzorků séra bylo postupně naředěno nulovým kalibrátorem a změřeno dle návodu uvedeného v soupravě. Průměrná výtěžnost po zředění byla 92,6 %. Následující rovnice pro změřenou koncentraci (Y) oproti očekávané koncentraci (X) prokazuje dobrou linearitu:

$$Y = 0,9899X - 4,2676 \quad R^2 = 0,9967 \quad n = 20$$

### Výtěžnost

Výtěžnost byla definována jako naměřený nárůst vyjádřený jako procento očekávaného nárůstu u vzorků obohacených přídatkem známých množství CA125. Průměrná procentuální výtěžnost 3 vzorků sér s přídatky CA125 na třech koncentračních hladinách byla 103,37 %, v rozmezí od 99 % do 107 %

### Hook efekt

U koncentrací nižších než 25000 U/ml nebyl pozorován žádný “hook efekt”.

### Očekávané hodnoty

Je doporučováno, aby si každá laboratoř určila referenční interval pro vlastní populaci pacientů.

Byly vyhodnoceny vzorky séra od 408 zjevně zdravých, netěhotných dárek krve:

<b>Počet vzorků</b>	<b>408</b>
Průměr (U/ml)	16,53
Medián (U/ml)	14,03
Vzorky < 35 U/ml	386 (94,6%)
Vzorky < 55 U/ml	404 (99,0%)

### Srovnání metod

Metoda CA125 IRMA (Y) byla porovnána s metodou Fujirebio Diagnostics Inc. CA125 RIA (X) pomocí 135 vzorků s koncentracemi v rozmezí od 5 do 500 U/ml. Lineární regresní analýza poskytla následující výsledky:

$$Y = 1,0168X - 1,0221 \quad R^2 = 0,9442$$

### **11. Poznámky k postupu**

- Nedodržování instrukcí v tomto návodu může výrazně ovlivnit výsledky.
- Složky z různých souprav nebo ze souprav jiných výrobců by neměly být zaměňovány nebo směřovány.
- Zdroj chyby! Reagenční zkumavky zabalené v plastových krabičkách nejsou jednotlivě značeny. Dbejte na to, aby nedošlo k jejich pomíchání s běžnými zkumavkami. Aby bylo minimalizováno toto nebezpečí nikdy nevyndávejte z krabičky více zkumavek, než je potřeba a všechny zbývající dávejte zpět do krabičky. Zkumavky je vhodné označit popisovačem.
- Zdroj chyby! Pro zajištění dostatečné rotace by měly být zkumavky pevně uchyceny ve stojánku. Nepoužívejte stojánek s volnými otvory. Nerovnoměrné nebo neúplné třepání může vyústit v nižší účinnost metody.

### **12. Omezení**

- Nepoužívejte metodu stanovení CA125 jako screeningový test nádorového onemocnění.
- Hodnoty CA125 vyšší nebo rovny 35 U/ml se mohou vyskytnout i u některých zdravých jedinců a u pacientů s nemaligním onemocněním.
- Hodnoty CA125 nižší než 35 U/ml nesevčdí o nepřítomnosti residualního ovariálního nádoru.
- Výsledky by měly být interpretovány s ohledem na celkový klinický stav pacienta, včetně klinické historie, výsledků dalších testů a jiných diagnostických metod.
- Vzorky pacientů, kteří obdrželi myší imunoglobuliny k diagnostickým nebo terapeutickým účelům, mohou obsahovat lidské protilátky proti myším protilátkám (HAMA). Sérum od těchto jedinců může poskytovat chybné výsledky.

### **13. Bezpečnostní opatření**

#### *Radioaktivita*

Tento produkt obsahuje radioaktivní materiál. Jeho uživatel je zodpovědný za dodržování místních předpisů a správné praxe týkajících se manipulace s radioaktivními materiály.

#### *Bioriziko*

Lidská krev použitá v této soupravě pochází od zdravých dárců, kteří byli jednotlivě testováni schválenými metodami (EIA, enzymová imunoanalýza) a jejichž výsledky testů na HIV protiláky (anti-HIV-1), povrchový antigen hepatitidy B (HbsAg) a protilátky proti bakterii Treponema (syfilis) byly negativní.

















Opatrnosti je třeba dbát vždy při manipulaci s lidskými vzorky během jejich měření diagnostickou soupravou. Přestože byl pacient testován, žádná metoda neposkytne úplnou jistotu, že v krvi nejsou přítomny viry Hepatitidy B, HIV-1, nebo jiná infekční agens. Se vzorky lidské krve by proto vždy mělo být nakládáno jako s potenciálně infekčním materiálem.

#### Chemické riziko

Složky soupravy obsahují azid sodný jako antimikrobiální činidlo. Odpad spláchněte velkým množstvím vody, aby se zamezilo tvorbě výbušných azidů kovových prvků v měděném nebo olověném potrubí. Celkový obsah azidu sodného v každém balení je 38,5 mg.

#### 14. Právní upozornění

CA125<sup>TM</sup> je obchodní známka firmy Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI). Souprava CA125 IRMA je založena na použití protilátek OC125 a M11, které jsou dostupné výhradně u FDI a jeho schválených distributorů.

	Použitelnost do		Kontrolní vzorek
	Číslo šarže		Kalibrátor(standard)
	Pozor, přečtěte si doprovodné materiály		Potažená zkušavka
	Biologické riziko		Radioindikátor
	Přečtěte si příbalovou informaci		Promývací pufr
	In-vitro zdravotnický diagnostický prostředek		Antisérum
	Výrobce		Ředící roztok
<b>REF</b>	Katalogové číslo		Skladujte při 2-8°C
	Radioaktivní materiál		<b>CE</b>