

Informace o výrobku

Informace o ostatních produktech jsou dostupné na www.demeditec.com

Návod k použití

CA15-3 IRMA

Souprava CA15-3 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení s tumorem asociovaného antigenu CA15-3 v lidském séru

1. Účel použití

Souprava CA15-3 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení s tumorem asociovaného antigenu CA15-3 v lidském séru v rozmezí 0-300 U/ml. Každá souprava obsahuje materiál dostačující pro měření 100 zkumavek, umožňující sestavení jedné kalibrační křivky a stanovení 42 neznámých vzorků v duplikátech.

2. Popis

CA15-3 je vysokomolekulární mucinový glykoprotein kódovaný genem MUC-1. Tento antigen je detekován dvěma monoklonálními protilátkami: DF3 a 115D8. Protilátka DF3 byla připravena proti membránové frakci lidského karcinomu prsu (Kufe et al., Hybridoma 1984;3(3):223-232) a protilátka 115D8 byla vytvořena proti antigenům membrán kuliček lidského mléčného tuku (Hilkens et al., Prot Biol fluids 1981;29:813-816).

Koncentrace antigenu CA15-3 je často zvýšená v séru pacientů s karcinomem prsu nebo s jinými maligními onemocněními, jako je karcinom vaječníků nebo plic. Některá nemaligní onemocnění (např. endometrioza, zánětlivá pánevní onemocnění nebo hepatitida), nebo fyziologické stavy jako těhotenství nebo laktace, mohou také zvyšovat hladiny CA15-3.

Stanovení CA15-3 není vhodné jako screeningový test, má však velký klinický význam pro diferenciální diagnostiku a prognózu karcinomu prsu, zhodnocení účinnosti léčby, včasnou detekci relapsu po léčbě první linie a dlouhodobé sledování pacientů v remisi.

3. Princip metody

Imunoradiometrické stanovení je založeno na dvoukrokové metodě. V prvním kroku jsou ve zkumavkách potažených streptavidinem inkubovány vzorky sér s biotinylovanou vychytávající („capture“) monoklonální protilátkou (115D8*). Během inkubace je imunokomplex navázán na reaktivní povrch stěn zkumavek. Poté jsou zkumavky promyty.

V druhém kroku je přidána signální monoklonální protilátka (DF3*) značená ¹²⁵I, která se váže na jiný epitop molekuly CA15-3 než ten, který je rozpoznán vychytávající protilátkou, což vede ke vzniku komplexu vychytávající protilátka-antigen-signální protilátka (tzv. „sandwich“). Poté je reakční směs vylita, zkumavky jsou dostatečně promyty a gama-čítačem je změřena jejich radioaktivita.

Koncentrace antigenu je přímo úměrná radioaktivitě změřené ve zkumavkách. Pomocí kalibrační křivky, kdy je vynášena vázaná radioaktivita proti řadě kalibrátorů obsahujících známé množství CA15-3, je stanovena neznámá koncentrace CA15-3 ve vzorcích pacientů.

* protilátky Fujirebio Diagnostics Inc.

4. Obsah soupravy

1. Jedna lahvička „TRACER“ (21 ml), připraveno k použití, radioindikátor obsahující protilátku ¹²⁵I-anti-CA15-3 (<980 kBq) v pufru s červeným barvivem a 0,1 % NaN₃.
2. Jedna lahvička „ANTISERUM“ (21ml), připraveno k použití, antisérum obsahující biotinylovanou vychytávající protilátkou v pufru s modrým barvivem a 0,1 % NaN₃.
3. Jedna lahvička (10ml) „DILUENT“ (DIL), obsahující koňské sérum a PBS pufr s 0,1 % NaN₃.
4. Šest lahviček „STANDARD S0-S5“ (6x 0,5ml), kalibrátory S0-S5 obsahující CA15-3 v lidském séru s 0,1 % NaN₃. Koncentrace kalibrátorů jsou uvedeny v příloženém certifikátu kvality.
5. Dvě lahvičky „CONTROL SERUM“ (2x 0,5 ml), kontrolní séra obsahující nízkou a vysokou koncentrací CA15-3 v lidském séru a 0,1 % NaN₃. Koncentrace kontrolních sér jsou uvedeny v příloženém certifikátu kvality.

6. Dvě krabičky „COATED TUBES“, potažené zkumavky, připravené k použití: 2x50 reagenčních zkumavek, 12x75 mm, zabalených v plastových krabičkách
7. Jedna lahvička „WASH BUFFER CONCENTRATE“ (40 ml), koncentrát promývacího pufru, obsahující 0,1 % NaN₃. *Viz příprava reagensí.*
8. Certifikát kvality
9. Příbalový leták

5. Potřebný materiál, pomůcky a vybavení

- běžné laboratorní vybavení
- mikropipeta na 10 µl
- opakovací pipeta na 200 µl
- opakovací pipeta nebo dávkovač na 2000 µl
- 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 CA15-3 o koncentraci vyšší než 300 U/ml by měly být zředěny ředícím roztokem a znovu analyzovány. Doporučené ředění: 10krát (450 µl DIL + 50 µl 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 v certifikátu kvality. Přidejte koncentrát promývacího pufru „WASH BUFFER CONCENTRATE“ (40ml) do 1400 ml destilované vody pro přípravu 1440 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. Popište dvě zkumavky na změření celkové aktivity (T – Total).
2. Napipetujte **10 µl** 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 **200 µl** antiséra do každé zkumavky (kromě T).
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 (min. 600 rpm).
5. Za protřepávání nechte zkumavky inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.

6. Do každé zkumavky přidejte **2,0 ml** zředěného promývacího pufru. Vylijte obsah všech zkumavek obrácením stojánku vzhůru nohama. V obrácené poloze dnem vzhůru ponechte stojánek stát na savém papíru po dobu alespoň 2 minut.
7. Obraťte stojánek zpět do normální polohy a dvakrát zopakujte promývací krok.
8. Napipetujte **200 µl** radioindikátoru do každé zkumavky.
9. 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 (min. 600 rpm).
10. Za protřepávání nechte zkumavky inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
11. Promyjte zkumavky podle bodů 6. a 7.
12. Proměřte každou zkumavku gama-čítačem po dobu alespoň 60 sekund.
13. Vypočtete koncentraci CA15-3 ve vzorcích podle níže uvedeného postupu (9. Výpočet výsledků), nebo použijte speciální software.

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

Zkumavky	Total	Kalibrátor	Kontrola	Vzorek
Kalibrátor		10		
Kontrolní sérum			10	
Vzorek				10
Antisérum		200	200	200
Protřepávejte 1 hod při pokojové teplotě				
Promývací pufr		2000	2000	2000
Slijte tekutinu a nechejte odkapat na savém papíru				
Dvakrát zopakujte promývací krok				
Radioindikátor	200	200	200	200
Protřepávejte 1 hod při pokojové teplotě				
Promývací pufr		2000	2000	2000
Slijte tekutinu a nechejte odkapat na savém papíru				
Dvakrát zopakujte promývací krok				
Změřte radioaktivitu (60 sekund/zkumavka)				
Vypočtete výsledky				

9. Výpočet výsledků

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

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

Vyneste relativní vazbu B/T(%) pro každý kalibrátor proti odpovídající koncentraci CA15-3. Stanovte koncentrace CA15-3 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(%)	CA15-3 U/ml
T	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
CI	10039	2,9	24,1
CII	19442	5,7	49,6

10. Validační parametry metody

Specifičnost

Protilátky použité v této metodě zajišťují naprosto specifickou detekci CA15-3.

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): 0,24 U/ml

Mez detekce (Limit of detection LoD): 1,35 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 <1,35 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 15 nezávislých stanoveních. Výsledky jsou uvedeny níže:

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

Linearita - diluční pokus

Pět jednotlivých vzorků sér o koncentracích mezi 200 a 300 U/ml bylo gravimetricky naředěno desetkrát ředícím roztokem a změřeno dle návodu uvedeného v soupravě. Výtěžnost po zředění byla 83,9 %, 85,6 %, 84,1 %, 92,1 % a 90,6 %.

Výtěžnost

Výtěžnost byla definována jako naměřený nárůst vyjádřený jako procento očekávaného nárůstu u vzorků obohacených přídatkem známých množství CA15-3. Průměrná procentuální výtěžnost 5 vzorků sér s přídatky CA15-3 na třech koncentračních hladinách byla 105,9 %, v rozmezí od 104 % do 108 %

Hook efekt

U koncentrací nižších než 7500 U/ml nebyl pozorován při měření žádný “hook efekt”.

Očekávané hodnoty

Je doporučováno, aby si každá laboratoř určila referenční interval pro vlastní populaci pacientů. Byly vyhodnoceny vzorky séra od zjevně zdravých dárců krve:

Počet vzorků	295
Průměr (U/ml)	14,67
Medián (U/ml)	14,24
Vzorky < 30 U/ml	294 (99,7%)
Vzorky < 25 U/ml	287 (97,3%)

Srovnání metod

Metoda DE53100 IRMA (Y) byla porovnána s metodou IBA-CIS CA15-3 IRMA (X) jako referenční metodou pomocí 172 vzorků s koncentracemi v rozmezí od 5 do 300 U/ml. Lineární regresní analýza poskytla následující výsledek:

$$Y = 1,0454X - 0,675 \quad R^2 = 0,9698$$

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! Pro zajištění dostatečné rotace by měly být zkumavky pevně uchyceny ve stojánku. Nepoužívejte stojánek s volnými otvory. Nerovnoměrné nebo neúplné protřepávání může vyústit ve nižší účinnost metody.

12. Omezení

- Nepoužívejte metodu stanovení CA15-3 jako screeningový test nádorového onemocnění.
- Hodnoty CA15-3 vyšší nebo rovny 30 U/ml se mohou vyskytnout i u některých zdravých jedinců a u pacientů s nemaligním onemocněním.
- Hodnoty CA15-3 nižší než 30 U/ml nesvědčí o nepřítomnosti residuálního nádoru prsu.
- Výsledky by měly být interpretovány ve spojení s celkovým klinickým stavem pacienta, včetně klinické historie, výsledků dalších testů a jiných diagnostických metod.
- Vzorky pacientů, kteří obdrželi myší imunoglobulin 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 týkající 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 protilátky (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 oloveném potrubí. Celkový obsah azidu sodného v každém balení je 96 mg.

14. Právní upozornění

CA15-3[®] je obchodní známka firmy Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI). Souprava CA15-3 IRMA je založena na použití protilátek DF3 a 115D8, které jsou dostupné výhradně u FDI a jeho schválených distributorů.

	Použitelnost do	CONTROL	Kontrolní vzorek
	Číslo šarže	CAL	Kalibrátor(standard)
	Pozor, přečtěte si doprovodné materiály	CT	Potažená zkumavka
	Biologické riziko	TRAC	Radioindikátor
	Přečtěte si příbalovou informaci	WASHB	Promývací pufr
	In-vitro zdravotnický diagnostický prostředek	AS	Antisérum
	Výrobce	DIL	Ředící roztok
REF	Katalogové číslo		Skladujte při 2-8°C
	Radioaktivní materiál		CE