

## Informace o výrobku

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

## Návod k použití

# CA72-4 IRMA

Souprava CA72-4 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení antigenu CA72-4 (s tumorem asociovaný glykoprotein 72) v lidském séru

## 1. Popis

Souprava CA72-4 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení TAG-72 (s tumorem asociovaný glykoprotein 72) v lidském séru v rozmezí 3-100 U/ml. Každá souprava obsahuje materiál dostačující pro měření 100 testovacích zkumavek, umožňující sestavení jedné kalibrační křivky a stanovení 44 neznámých vzorků v duplikátech.

## 2. Úvod

TAG-72 (jinak také CA72-4) je vysokomolekulární mucinový glykoprotein, který se vyskytuje převážně u maligních tumorů gastrointestinálního traktu. TAG-72 byl poprvé detekován myší monoklonální protilátkou B72.3, získanou imunizací myši pomocí obohacené frakce metastázy karcinomu prsu (Colcher et al, 1981). Čištěný antigen byl použit pro výrobu druhé generace monoklonálních protilátek, z nichž byla vybrána protilátka CC49 k vývoji imunoanalýzy se dvěma determinantami (Gero et al, 1989). Obě protilátky rozpoznávají na molekule TAG-72 jiné oligosacharidové epitopy.

Toto stanovení bylo použito v několika klinických studiích a vykazovalo dobrou sensitivitu a specifickou vzhledem ke karcinomu žaludku. Zvýšené hladiny TAG-72 v séru byly také zjištěny u karcinomu vaječníku, pankreatu, střeva, žlučníku, prsu, děložního čípku a endometria. CA72-4 je marker vhodný k monitorování účinnosti terapie a dalšímu sledování pacientů s karcinomem žaludku.

## 3. Princip metody

V technologii imunoradiometrického stanovení (IRMA) jsou využity dvě monoklonální protilátky s vysokou afinitou. Stanovení je založeno na dvoukrokové metodě. V prvním kroku jsou ve zkumavkách potažených streptavidinem inkubovány vzorky sér s biotinylovanou vychytávající („capture“) monoklonální protilátkou (CC49\*). Během inkubace za stálého protřepávání je imunokomplex navázán na reaktivní povrch stěn zkumavek. Poté jsou zkumavky promyty.

V druhém kroku je přidána signální monoklonální protilátka (B72.3\*) značená  $^{125}\text{I}$ , která se váže na jiný epitop molekuly CA72-4 než ten, který je rozpoznán vychytávající protilátkou, což vede ke vzniku komplexu vychytávající protilátka-antigen-signální protilátka (tzv. „sandwich“). Poté je reakční směs vylita a po dostatečném promytí zkumavek je gamačítačem 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 CA72-4, je stanovena neznámá koncentrace CA72-4 ve vzorcích pacientů.

\*protilátky Fujirebio Diagnostics Inc.

## 4. Obsah soupravy

1. Jedna lahvička „TRACER“ (21 ml), připraveno k použití, radioindikátor obsahující protilátku  $^{125}\text{I}$ -B72.3 (<980 kBq) v pufru s červeným barvivem a 0,1 %  $\text{NaN}_3$ .
2. Jedna lahvička „ANTISERUM“ (11ml), připraveno k použití, antisérum obsahující biotinylovanou protilátkou CC49 v pufru s modrým barvivem a 0,1%  $\text{NaN}_3$ .
3. Jedna lahvička „DILUENT“ (5 ml), ředící roztok obsahující koňské sérum a PBS pufr s 0,1%  $\text{NaN}_3$ .
4. Čtyři lahvičky „STANDARD S1-S4“ (4x 1ml), kalibrátory S1-S4 obsahující přibližně 3-20-50-100 U/ml CA72-4 v lidském séru s 0,1%  $\text{NaN}_3$ . Koncentrace kalibrátorů jsou uvedeny v příloženém certifikátu kvality. *Kalibrace byla provedena pomocí Fujirebio Diagnostics Inc. CA72-4RIA.*

5. Dvě lahvičky „CONTROL SERUM“ CI, CII (2x 1 ml), kontrolní séra obsahující nízkou a vysokou koncentraci CA72-4 v lidském séru a 0,1% NaN<sub>3</sub>. Koncentrace kontrolních sér jsou uvedeny v příloženém certifikátu kvality.
6. Dvě krabičky „COATED TUBES“, streptavidinem 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% NaN<sub>3</sub>. *Viz příprava reagensí.*
8. Certifikát kvality
9. Příbalový leták

## 5. Potřebný materiál, pomůcky a vybavení

- stojan na zkumavky
- mikropipeta s vyměnitelnými špičkami (100, 200 a 2000 µl)
- destilovaná voda
- vortex mixer
- třepačka
- plastická folie
- savá buničina (papír)
- gama-čítač

## 6. Doporučené pomůcky a vybavení

- opakovací pipety (např. Eppendorf nebo jiné)
- dávkovač se zásobníkem na alespoň 1,5 l (místo pipety na 2 ml)

## 7. 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 CA72-4 o koncentraci vyšší než 100 U/ml by měly být zředěny ředícím roztokem a znovu analyzovány. Doporučené ředění: 10krát (450 µl DIL + 50 µl vzorku).*

## 8. 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“ (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.

## 9. Postup stanovení

(Zkrácený návod viz tabulka 1)

1. Popište potažené zkumavky v duplikátech pro každý kalibrátor (S1-S4), kontrolní sérum a vzorky. Popište dvě zkumavky na celkový počet impulsů (T, total counts).
2. Napipetujte **100 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 **100 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 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 obrácené poloze dnem vzhůru ponechte stojánek stát na savém papíru po dobu alespoň 2 minut.
7. Obraťte stojánek zpět do vzpřímené polohy a dvakrát zopakujte promývací krok.
8. Napipetujte **200 µl** radioindikátoru do každé zkumavky.
9. Uzavřete všechny zkumavky plastovou folií. Zkumavky inkubujte přes noc (18 až 22 hodin) při teplotě 2-8 °C.
10. Promyjte zkumavky podle bodů 6. a 7.
11. Proměřte každou zkumavku gama-čítačem po dobu alespoň 60 sekund.
12. Vypočtete koncentraci CA72-4 ve vzorcích podle níže uvedeného postupu (10. Výpočet výsledků) nebo použijte speciální software.

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
Antisérum		100	100	100
Protřepávejte 2 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
Inkubujte přes noc při 2-8 °C				
Promývací pufr		2000	2000	2000
Slijte tekutinu a nechejte odkapat na savém papíru				
Dvakrát zopakujte promývací krok				
Změřte radioaktivitu (60 sekund/zkumavka)				
Vypočtete výsledky				

## 10. 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,

$$B/T(\%) = \frac{S_{1-4} / C_{I-II} / M_x(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Na semilogaritmickém papíru vyneste B/T(%) pro každý kalibrátor proti odpovídající koncentraci CA72-4. Stanovte koncentraci CA72-4 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(%)	CA72-4 U/ml
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
CII	25248	10,2	59,4

## 11. Validační parametry metody

### Specifičnost

Protilátky použité v této metodě zajišťují naprosto specifickou detekci CA72-4.

### Detekční mez

Na základě 120 stanovení (60 slepých vzorků (ředícího roztoku) a 20 vzorků s nízkým obsahem analytu (< 3 U/ml)) ve třech replikátech byla s 95% pravděpodobností určena tato detekční mez:

Mez detekce (limit of detection LoD) = 1,94 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 22 nezávislých stanoveních. Výsledky jsou uvedeny níže:

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

### Linearita - diluční pokus

Čtyři jednotlivé vzorky séra byly desetkrát gravimetricky naředěny ředícím roztokem a změřeny dle návodu uvedeného v soupravě. Výsledky uvedeny níže:

<b>Vzorek</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
CA72-4 U/ml	71,67	72,78	56,33	76,6
Ředění	9,76	9,76	9,78	9,76
Očekávané U/ml	7,34	7,45	5,76	7,85
Naměřené U/ml	7,81	7,67	5,64	8,01
Oček./Nam. (%)	106,4	102,9	97,9	102,1

#### Výtěžnost

Výtěžnost byla definována jako naměřený nárůst vyjádřený jako procento očekávaného nárůstu u vzorků obohacených přídatkem známých množství CA72-4. Průměrná procentuální výtěžnost 5 vzorků sér s přídatkem CA72-4 na třech koncentračních hladinách byla 101,44 %, v rozmezí od 91 % do 117 %

#### Hook efekt

U koncentrací nižších než 1100 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 300 zjevně zdravých dárců krve (150 mužů a 150 žen):

<b>Medián (U/ml)</b>	1,47
<b>Průměr (U/ml)</b>	1,77
<b>Standardní odchylka (U/ml)</b>	1,94
<b>Vzorky &lt; 4 U/ml</b>	285 (95,0 %)

#### Srovnání metod

Metoda CA72-4 IRMA (Y) byla porovnána s metodou Fujirebio Diagnostics Inc. CA72-4 RIA (X) pomocí 68 vzorků s koncentracemi v rozmezí od 2 do 100 U/ml. Lineární regresní analýza poskytla následující výsledky:

$$Y = 1,087X - 0,1828 \quad R^2 = 0,9529$$

## 12. 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 protřepávání může vyústit v nižší účinnost metody.

## 13. Omezení

- Nepoužívejte metodu stanovení CA72-4 jako screeningový test nádorového onemocnění.
- Hodnoty CA72-4 vyšší nebo rovny 4 U/ml se mohou vyskytnout i u některých zdravých jedinců a u pacientů s nemaligním onemocněním.
- Hodnoty CA72-4 nižší než 4 U/ml nesvědčí o nepřítomnosti residuálního 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 myši imunoglobuliny k diagnostickým nebo terapeutickým účelům, mohou obsahovat lidské protilátky proti myším protilátkám (HAMA). Sérum od těchto jedinců může poskytovat chybné výsledky.

## 14. 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 HIVprotilátky (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 měly 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 80 mg.

## 15. Právní upozornění

CA72-4<sup>®</sup> je obchodní známka firmy Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI). Souprava CA72-4 IRMA je založena na použití protilátek B72.3 a CC49, které jsou dostupné výhradně u FDI a jeho schválených distributorů.

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