

Návod k použití

Informace o produktech jsou dostupné na internetových stránkách: www.demeditec.com

TPA IRMA

Radioimunoanalýza pro kvantitativní stanovení cytokeratinu 8 a 18 v séru

Prosím používejte pouze platnou verzi příbalového letáku přiloženého v soupravě.

Obsah:

1. Účel použití
2. Princip stanovení
3. Specificita metody
4. Vzorky
5. Upozornění pro uživatele
6. Potřebný materiál, který není součástí soupravy
7. Součásti soupravy TPAcyk IRMA
8. Postup stanovení
9. Zpracování výsledků
10. Skladování reagensů
11. Omezení metody
12. Vlastnosti metody
13. Záruka
14. Reference/literatura

1. Účel použití

TPAcyk IRMA je jedнокroková *in vitro* diagnostická metoda pro kvantitativní stanovení cytokeratinu 8 a 18 v séru. Tento test je citlivým indikátorem aktivity nádorových buněk a je užitečný v oblasti léčby pacientů s karcinomem epitelálního původu.

2. Princip stanovení

TPAcyk IRMA je radiometrická sendvičová analýza na pevné fázi založená na imunochemických technikách. Během inkubace reagují standardy, kontrolní vzorky a vzorky v označených zkumavkách současně s vychytávacími protilátkami (6D7 a 3F3) v pevné fázi a detekční protilátkami značenými ^{125}I . Po promytí je radioaktivita změřena gama-čítačem. Radioaktivita je přímo úměrná koncentraci analytu.

3. Specificita metody

TPAcyk stanovuje hlavní epitopy fragmentů TPA (tkáňový polypeptidový antigen). Monoklonální 6D7 a 3F3 protilátky používané při stanovení jsou specifické pro cytokeratin 8 a 18, s žádnou detekovatelnou cross-reaktivitou s antigeny asociovanými s jinými tumory, které mohou být přítomny ve vzorcích pacienta.

4. Vzorky

Je doporučeno použít vzorky sér.

Mělo by být odebráno dostatek krve na 2 x 100 μl séra (duplikáty) ke každé analýze.

Pokud je analýza provedena do 24 hodin, sérum by mělo být uchováno v ledničce (2 – 8 °C).

Při pozdější provedení musí být sérum v aliquotních podílech zmrazeno (< 18 °C).

Zamezte opakovanému rozmrazování a zmrazování. Nepoužívejte sérové vzorky, které jsou silně lipemické, hemolyzované nebo kontaminované.

5. Upozornění pro uživatele

5.1 Obecné

1. TPAcyk IRMA slouží pouze pro *in-vitro* diagnostické účely.
2. Při práci se soupravou používejte ochranné rukavice a ochranné brýle.
3. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti.
4. Nemíchejte reagensie z různých šarží.

5. Všechny vzorky pacientů by měly být považovány za infekční materiál a mělo by být zpracovávány a likvidovány dle příslušných předpisů.
6. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagensů.
7. Analýza by měla být provedena dle principů správné laboratorní praxe GLP.
8. Přesnost testu závisí na dodržování předepsaného postupu a přesnosti při pipetování.
9. ProClin 300 (60 ppm) použitý v přípravu jako konzervační činidlo může způsobovat alergie. V případě kontaktu oplachujte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.
10. Bezpečnostní listy soupravy k dispozici na vyžádání.

5.2 Radioaktivní materiál

1. S radioaktivním materiálem musí být zacházeno v souladu s místními předpisy a může být přijímán, získáván, přechováván a používán pouze držiteli s příslušnými povoleními.
2. Radioaktivní materiál by měl být skladován a zpracováván pouze ve vyhrazených prostorách. Rozlitý materiál ihned dekontaminujte. Umyjte všechny kontaminované plochy vhodným detergentem.
3. Nejezte, nepijte a nekuřte v prostorách určených pro práci se soupravou.
4. Noste ochranné rukavice a brýle během manipulace s radioaktivním materiálem, poté si důkladně umyjte ruce.
5. Veškerý použitý materiál by měl být považován za radioaktivní a při likvidaci uložen do odpadních nádob k tomu určených.

6. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

Gama čítač pro ^{125}I (účinnost > 40 %)

Třepačka na zkumavky

Mycí potřeby na zkumavky

Dávkovač pro přidávání kuliček do zkumavek

Běžné laboratorní vybavení, např. mikropipeta a vibrační míchadlo (vortex)

7. Součásti soupravy TPAcyk IRMA

Dodaný materiál na 100 stanovení

Kuličky potažené protilátkou TPA cyk (coated beads)

1 lahev, 100 suchých kuliček potažených monoklonální protilátkou proti cytokeratinu 8/18 (6D7 a 3F3). Baleno s vysoušedlem. Připraveno k použití.

Radioindikátor TPA cyk IRMA ^{125}I (tracer)

1 lahvička, 11 ml, protilátka značená ^{125}I v proteinovém pufru, pH 7,5. Radioaktivita ~ 1,1 MBq/lahvička. Červeně zbarveno. S přísávkem konzervačního činidla. Připraveno k použití.

Diluent TPAcyk (standard 0 ng/ml)

1 lahvička, 15 ml, roztok pro naředění vzorku a standard o koncentraci 0 ng/ml, proteinový pufr, pH 7,5. S přísávkem konzervačního činidla. Připraveno k použití.

Standard TPAcyk IRMA (0,5, 1, 2, 5, 15, 30 ng/ml)

6 lahviček standardů, 1 ml/lahvička, standardní vzorky TPAcyk v proteinovém pufru pH 7,5. Koncentrace uvedena na lahvičce. S přísávkem konzervačního činidla. Připraveno k použití.

Kontroly TPAcyk (nízká, vysoká koncentrace) (control - low, high)

2 lahvičky kontrolních roztoků (1 ml/lahvička), lyofilizované roztoky, standardní vzorek TPAcyk v proteinovém pufru pH 7,5. Žlutě zbarveno. S přísávkem konzervačního činidla.

Tablety pro přípravu promývacího roztoku (wash tablets)

2 balení, 1 tableta/balení

Každá tableta by měla být rozpuštěna v 500 ml čerstvé deionizované vody

Certifikát TPAcyk IRMA

1 protokol. Certifikát obsahu šarže.

8. Postup stanovení

Zkouška (viz diagram) by měla být provedena při pokojové teplotě (RT; 22 ± 6 °C)

1. Nechte vytemperovat reagentie na pokojovou teplotu RT. Promíchejte všechny reagentie pomocí vortexu.
2. Zřeďte kontrolní roztoky TPAcyk (nízká, vysoká koncentrace) 1,0 ml čerstvé deionizované vody. Lahvičky nechte stát, po 10 minutách je důkladně promíchejte. Roztoky jsou připraveny k použití 15 minut po rekonstituci.
3. Do zkumavky napipetujte 100 μ l standardů, kontrol nebo vzorků (duplikátní vzorky).
4. Do každé zkumavky přidejte jednu kuličku.
5. Do každé zkumavky přidejte 100 μ l radioindikátoru TPAcyk IRMA 125 I. Přikryjte zkumavky plastovou fólií. *Pozor: Kroky 4 a 5 by měly být provedeny postupně bez přerušlení.*
6. Inkubujte po dobu 4 h \pm 5 min na třepačce (~ 450 rpm).
7. Připravte promývací roztok. Každou tabletu rozpuste v 500 ml čerstvé deionizované vody.
8. Slijte zkumavky a třikrát promyjte 3 ml promývacího roztoku (3 x 3 ml)
9. Změřte radioaktivitu v gama-čítači. Přidejte dvě prázdné zkumavky pro změření cpm pozadí.
10. Vypočtete koncentraci (ng/ml) cytokeratinu 8 a 18 ve vzorcích. Vzorky vykazující koncentraci vyšší než 30 ng/ml je třeba před opakovaním měření vhodně naředit diluentem TPAcyk (standard 0 ng/ml).

Diagram

Do zkumavky napipetujte 100 μ l standardu/kontroly/vzorku

Do zkumavky přidejte 1 kuličku

Do zkumavky přidejte 100 μ l radioindikátoru

Inkubujte 4 hod na třepačce při RT

Slijte a promyjte

Změřte radioaktivitu v gamačítači

9. Zpracování výsledků

Manuální výpočet nebo využití počítačového softwaru pro zpracování dat typu IRMA (sestrojení křivky - vyhlazení pomocí funkce spline). Pro získání platných dat ověřte, že kontrolní vzorky leží v daném rozmezí.

Manuální zpracování výsledků:

Opravte každou naměřenou hodnotu cpm (počty impulsů za minutu) odečtením radioaktivity pozadí (cpm). Odhadněte průměrnou hodnotu každého duplikátu. Sestrojte kalibrační křivku vynesemím průměrné hodnoty cpm každého standardu (osa y) proti odpovídající koncentraci (osa x). Odečtete koncentrace vzorků z kalibrační křivky.

10. Skladování reagensů

Souprava by měla být skladována při 2-8 °C. **Nezmrazujte!**

Skladujte reagensy v jejich původních obalech, pokud nejsou spotřebovány najednou. Lahev s potaženými kuličkami včetně vysoušedla znovu uzavřete, pokud nejsou všechny kuličky spotřebovány najednou.

Promývací roztok je stálý po dobu 4 týdnů při skladování při 2-8 °C.

Rekonstituované kontroly jsou stálé po dobu 4 týdnů při skladování při 2-8 °C.

11. Omezení metody

Tato metoda by neměla být používána jako screeningový test na rakovinu. Hodnoty by měly být interpretovány společně se všemi dostupnými klinickými informacemi. Zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat např. v případě těhotenství, onemocnění jater, selhání ledvin a povšechných infekcích. V případě podezření na přechodnou infekci může být nutné zopakovat test za dva týdny.

12. Vlastnosti metody

Rozsah měření

Rozsah měření je 0-30 ng/ml. Metoda nevykazuje žádný „Hook“ efekt způsobený vysokou koncentrací až do koncentrace 500 ng/ml.

Opakovatelnost

Opakovatelnost kalibrační křivky v sérii (intra-assay) má obvykle variační koeficient nižší než 5 % (CV < 5 %, při měření duplikátních vzorků). Přesnost v čase mezi sériemi (inter-assay) je charakteristicky 5-10 % CV.

Citlivost

Minimální detekovatelná koncentrace v metodě TPACyk IRMA je 0,1 ng/ml, definovaná jako koncentrace TPA odpovídající cpm, které se liší o tři standardní odchylky od cpm standardu 0 ng/ml.

Očekávané hodnoty

95. percentil u zjevně zdravých jedinců (dárci krve - Švédsko) byl stanoven na 1,0 ng/ml. Vzhledem k rozdílům mezi laboratořemi a místním rozdílům s ohledem na populaci, laboratorní techniku a výběr referenčních skupin se doporučuje, aby si každá laboratoř stanovila vlastní rozmezí normálních hodnot.

Výtěžnost

Do vzorků lidských sér byla přidána daná množství TPACyk. Výtěžnost byla stanovena na 86-101 %.

13. Záruka

Výše uvedené údaje o vlastnostech metody byly získány při zkouškách provedených dle předepsaného postupu. Jakákoli změna nebo modifikace postupu nedoporučená firmou DEMEDITEC může mít vliv na výsledky. V takovém případě firma DEMEDITEC zřídá se/odvolává/neposkytuje žádné veškeré záruky, ať už výslovné, implicitní nebo ze zákona povinné, včetně záruk prodejnosti a vhodnosti pro daný účel.

14. Reference/literatura

1. Stigbrand, T. et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Silén, Å. et al. A novel IRMA and ELISA for quantifying cytokeratin 8 and 18 fragments in the sera of healthy individuals and cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 153-161.

3. Correale, M. et al. TPACyk assay in cytosol from primary breast cancer: preliminary results. Int J Biol Markers 1994; 9: 264-265.

Symboly

Viz návod k použití

Evropská shoda

In-vitro diagnostická pomůcka

Pouze pro výzkumné účely

Katalogové číslo

Číslo šarže

Obsah postačující pro <n> zkoušek

Teplota skladování

Datum expirace

Výrobce

Distributor

Obsah

Verze/číslo