

## Informace o výrobku

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

## Návod k použití

# CA19-9 IRMA

Souprava CA19-9 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení s tumorem asociovaného antigenu CA19-9 v lidském séru

## 1. Popis

Souprava CA19-9 IRMA umožňuje přímé in-vitro kvantitativní stanovení s tumorem asociovaného antigenu CA19-9 v lidském séru v rozmezí 0-240 U/ml. Každá souprava obsahuje materiál dostačující pro měření 100 testovacích zkumavek, umožňující sestavení jedné kalibrační křivky a stanovení 42 neznámých vzorků v duplikátech.

## 2. Úvod

CA19-9 je s tumorem asociovaný vysokomolekulární glykoproteinový antigen mucinového typu, vyskytující se v krvi a v tkáních. Jeho stanovení je užitečné při sledování pacientů s prokázaným nádorem pankreatu, jejichž hladiny CA19-9 jsou v čase diagnózy vyšší než rozhodovací limit („cut-off“ limit). U pacientů negativních na přítomnost Lewis-antigenu krevní skupiny se CA19-9 nevyskytuje ani v přítomnosti maligního onemocnění.

## 3. Princip metody

Koncentrace CA19-9 se stanovuje pomocí protilátky 1116NS19-9\* rozpoznávající specifický epitop. Na různých místech povrchu molekuly CA19-9 je přítomen stejný epitop. V technologii imunoradiometrického stanovení (IRMA) se využívá monoklonální protilátka s vysokou afinitou.

Během třepání na třepačce se v průběhu první jednododinové inkubace váže biotinylovaná vychytávající (tzv. „capture“) protilátka 1116NS19-9\* na specifický epitop molekuly CA19-9. Po promytí zkumavek, během třepání na třepačce v průběhu druhé jednododinové inkubace, je prostorově rozdílný, ale jinak totožný epitop rozpoznán signální protilátkou 1116NS19-9\* značenou <sup>125</sup>I. Stejně, ale rozdílně značené protilátky reagují ve dvou samostatných krocích s antigenem přítomným v kalibrátorech a vzorcích, což vede ke vzniku komplexu **vychytávající protilátka-antigen-signální protilátka** (tzv. homo-sandwich). Tento imunokomplex je imobilizován na reaktivním povrchu zkumavky potažené streptavidinem. Po vylití reakční směsi a kompletním promytí zkumavek je radioaktivita změřena gama-čítačem.

Koncentrace antigenu je přímo úměrná radioaktivitě změřené ve zkumavkách. Pomocí kalibrační křivky, kdy je vynášena vázaná radioaktivita proti řadě kalibrátorů obsahujících známé množství CA19-9, je stanovena neznámá koncentrace CA19-9 ve vzorcích pacientů.

## 4. Obsah soupravy

1. Jedna lahvička „TRACER“ (21 ml), připraveno k použití, radioindikátor obsahující protilátku <sup>125</sup>I-anti-CA19-9 (<980 kBq) (1116NS19-9\* - viz bod 14. Právní upozornění) v pufru s červeným barvivem a 0,1% KathonCG jako konzervačním činidlem.
2. Jedna lahvička (11 ml) „ANTISERUM“, antisérum obsahující biotinylovanou protilátku anti-CA19-9 (1116NS19-9\*) v pufru s modrým barvivem a 0,1% KathonCG jako konzervačním činidlem. Připraveno k použití.
3. Dvě lahvičky (2,5 ml) „DILUTION SERUM“ (S0), ředící sérum v matrici myšního séra s 0,1% KathonCG jako konzervačním činidlem. Připraveno k použití.
4. Pět lahviček „STANDARD S1-S5“ (5x 1ml), kalibrátory S1-S5 obsahující CA19-9 v lidském séru s 0,1% KathonCG jako konzervačním činidlem. Připraveno k použití. Koncentrace kalibrátorů jsou uvedeny v příloženém certifikátu kvality.
5. Dvě lahvičky „CONTROL SERUM“ CI, CII (1 ml), kontrolní séra obsahující CA19-9 v lidském séru a 0,1% KathonCG jako konzervační činidlo. Připraveno k použití. 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“ (20 ml), koncentrát promývacího pufu, obsahující 0,1% KathonCG jako konzervační činidlo. *Viz příprava reagensí.*
8. Certifikát kvality
9. Příbalový leták

#### **5. Potřebný materiál, pomůcky a vybavení**

- stojan na zkumavky
- mikropipeta s vyměnitelnými špičkami na 100 µl
- opakovací pipety na 200 a 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 CA19-9 o koncentraci vyšší než 240 U/ml by měly být zředěny ředícím sérem S0 a znovu analyzovány. Doporučené ředění: 10krát (450 µl S0 + 50 µl vzorku).*

#### **7. Příprava reagensí, skladování**

Reagencie, které jsou připraveny k použití, 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 certifikátu kvality. Přidejte koncentrát promývacího pufu „WASH BUFFER CONCENTRATE“ (20ml) do 1200 ml destilované vody pro přípravu 1220 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, S<sub>1</sub>-S<sub>5</sub>), kontrolní sérum (CI, CII), a vzorek (M<sub>x</sub>). Můžete popsat dvě zkumavky na změření celkové aktivity (T – Total).
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 – viz tabulka níže).
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 600 rpm)
5. Za protřepávání nechejte 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 ponechejte 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 (doporučuje se 600 rpm)
10. Za protřepávání nechejte zkumavky inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
11. Do každé zkumavky přidejte **2,0 ml** zředěného promývacího pufru. Vylijte obsah všech zkumavek obrácením stojánku vzhůru nohama. V této pozici ponechejte stojánek stát na savém papíru po dobu alespoň 2 minut.
12. Obraťte stojánek zpět do normální polohy a dvakrát zopakujte krok 6.
13. Proměřte každou zkumavku gama-čítačem po dobu alespoň 60 sekund.
14. Vypočítejte koncentraci CA19-9 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/S0		100		
Kontrolní sérum			100	
Vzorek				100
Antisérum		100	100	100
Protřepávejte 1 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				
Radioindikátor	200	200	200	200
Protřepávejte 1 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)
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:

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

Na semilogaritmickém papíru vyneste B/T(%) pro každý kalibrátor proti odpovídající koncentraci CA19-9. Stanovte koncentraci CA19-9 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(%)	CA19-9 U/ml
T	382 114		
S0	153	0,04	
S1	6 055	1,58	
S2	11 986	3,14	
S3	23 154	6,06	
S4	44 918	11,8	
S5	85 919	22,5	
CI	9 011	2,36	22,4
CII	27 325	7,15	73,1

## 10. Validační parametry metody

### Specifičnost

Protilátka použitá v této metodě zajišťuje naprosto specifickou detekci CA19-9.

### Citlivost

Analytická citlivost neboli minimální detekovatelná hodnota (MDD – minimum detectable dose) je vypočtena interpolací součtu střední hodnoty cpm ředícího séra a dvojnásobku standardní odchylky z kalibrační křivky. Stanovení bylo provedeno z hodnot získaných měřeními 20 replikátů ředícího séra. Hodnota analytické citlivosti je 0,1 U/ml při použití čerstvého radioindikátoru.

### Preciznost a reprodukovatelnost

Tři směsi séra byly měřeny ve 20 replikátech za účelem stanovení preciznosti v sérii. Pro stanovení preciznosti mezi sériemi byly vzorky měřeny v duplikátech v 65 nezávislých stanoveních. Výsledky jsou uvedeny níže:

V sérii		Mezi sériemi	
Průměr (U/ml)	CV %	Průměr (U/ml)	CV %
2,15	8,5	2,15	15,6
36,5	6,1	35,7	6,2
216,4	2,0	194,3	5,4

### Linearita - diluční pokus

Pět jednotlivých vzorků séra bylo postupně naředěno nulovým kalibrátorem a změřeno dle návodu uvedeného v soupravě. Průměrná výtěžnost po zředění byla 108,0%. Následující rovnice pro očekávanou koncentraci (Y) oproti změřené koncentraci (X) prokazuje dobrou linearitu:

$$Y = 0,9723X - 1,57 \quad R^2 = 0,9963 \quad n = 15$$

### Výtěžnost

Výtěžnost byla definována jako naměřený nárůst vyjádřený jako procento očekávaného nárůstu u vzorků obohacených přídatkem známých množství CA19-9. Průměrná procentuální výtěžnost 6 vzorků sér s přídatky CA19-9 na třech koncentračních hladinách byla 94,4 %, v rozmezí od 86,7 % do 101,1 %

### Hook efekt

U koncentrací nižších než 1 500 000 U/ml nebyl pozorován žádný "hook efekt".

### Rozhodovací limit (cut-off) a distribuce hodnot

Je doporučováno, aby si každá laboratoř stanovila svůj cut-off limit pro vlastní populaci pacientů.

Hodnota cut-off: 37 U/ml

Byly vyhodnoceny vzorky séra od 494 zjevně zdravých dárců krve:

<b>Počet vzorků</b>	<b>494</b>
Vzorky s 0 U/ml	39
Průměr (U/ml)	4,87
Medián (U/ml)	3,22
Vzorky < 37 U/ml	493

### Srovnání metod

Metoda RK-199CT IRMA (Y) byla porovnána s metodou Fujirebio Diagnostics Inc. CA19-9 RIA (X) pomocí 60 vzorků s koncentracemi v rozmezí od 0 do 240 U/ml. Lineární regresní analýza poskytla následující výsledek:

$$Y = 1,106X - 1,524 \quad R^2 = 0,893$$

## 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 nevynadávejte 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 CA19-9 jako screeningový test nádorového onemocnění.
- Hodnoty CA19-9 vyšší nebo rovny 37 U/ml se mohou vyskytnout i u některých zdravých jedinců a u pacientů s nemaligním onemocněním.
- 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 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. I když 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 Kathon CG jako antimikrobiální činidlo. Celkový obsah Kathon CG v každém balení je 64 mg.

## 14. Právní upozornění

\*CA19-9<sup>TM</sup> je obchodní známka firmy Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI). Souprava CA19-9 IRMA je založena na použití protilátky 1116NS19-9.

	Použitelnost do	<b>CONTROL</b>	Kontrolní vzorek
	Číslo šarže	<b>CAL</b>	Kalibrátor(standard)
	Pozor, přečtěte si doprovodné materiály	<b>GT</b>	Potažená zkumavka
	Biologické riziko	<b>TRAC</b>	Radioindikátor
	Přečtěte si příbalovou informaci	<b>WASHB</b>	Promývací pufr
	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>