

TSEKKI/ČESKY

UniQ®

PIIINP_{RIA}

**Intaktní N-terminální propeptid prokolagenu typu III
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky
s navázanou protilátkou
Kat.č.68570**

Září 2013

Návod k použití soupravy

Určený účel použití	3
Klinický význam PIIINP	3
Princip testu	4
Reagencie	5
Přístroje	7
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	7
Pracovní postup	8
Omezení metody	9
Zajištění jakosti	9
Výpočet výsledků	10
Referenční hodnoty	11
Analytické parametry měření	12
Literatura (viz.anglický návod k použití)	



Výrobce:

Orion Diagnostica Oy
Koivu-Mankkaan tie 6 B
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland
Tel. +358-10-4261, Fax +358-10-426 2794
www.oriondiagnostica.com



Vysvětlení použitých symbolů



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Použitelné do



Teplotní rozmezí



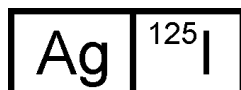
Viz návod k použití



Výrobce



Vhodné pro



Radioindikátor



Antisérum



Kontrol



Koncentrace kalibrátoru



Původ: lidský



Obsahuje azid sodný



Škodlivé

URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Orion Diagnostica UniQ PIIINP RIA je kvantitativní radioimunoanalytický test určený pro stanovení koncentrací aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu III v lidském séru *in vitro*.

KLINICKÝ VÝZNAM PIIINP

Kolagen typu III je syntetizován jako prokolagen obsahující propeptidová prodloužení na obou koncích molekuly. Některé aminoterminální propeptidy se během syntézy a ukládání kolagenu typu III uvolní, některé jsou zadrženy v molekulách, které zůstávají na povrchu kolagenových vláken. Je-li tento antigen nalezen v séru, může tedy pocházet buď ze syntézy (včetně pozdního zpracování) nového kolagenu typu III, nebo z degradace existujících fibril kolagenu typu III.

Podrobné údaje o dalším metabolismu PIIINP nejsou dosud známy. Menší degradační produkty související s PIIINP se nacházejí v séru a jsou vylučovány močí. V séru se rovněž nacházejí antigeny o vyšší molekulové hmotnosti než propeptid. Jejich přesná molekulová stavba není dosud známa.

Zvýšené koncentrace PIIINP se vyskytují u řady klinických stavů, kde dochází buď k hromadění, nebo rozpadu pojivové tkáně, tj. při fibroproliferativních, hematologických, endokrinologických a maligních onemocněních. Změny v hladině PIIINP tedy nejsou specifické pro určitou chorobu, nýbrž odrážejí účast kolagenu III a změny jeho metabolismu.

Reakce na léčbu růstovými hormony u dětí s růstovým deficitem se odráží rychle zvýšenou hladinou PIIINP v séru poskytující možnost identifikovat pacienty odpovídající na léčbu.

Při jaterní fibróze a cirhóze různého původu vzrůstá koncentrace PIIINP. PIIINP poskytuje neinvazivní způsob kontroly léčby methotrexátem čímž se snižuje potřeba provést biopsii jater.

U pacientů s chronickou hepatitidou C s pokročilou fibrózou je PIIINP užitečným nástrojem pro sledování změn v průběhu fibrózy a po antivirové terapii a zároveň může u těchto pacientů poskytnout prognostické informace. Při fibrotickém stavu plic jako je idiopatická fibróza plic nebo pulmonární sarkoidóza, hladina PIIINP v séru může být v normě, ale vysoká koncentrace může být zjištěna v bronchoalveolárním promývacím roztoku.

Hladina PIIINP je zvýšena u myeloproliferativních chorob, zejména během aktivní fáze myelofibrózy. Při výskytu polycythaemia vera mohou vysoké hladiny PIIINP naznačovat, že došlo k transformaci na myeloidní metaplasii.

Zvýšené hladiny PIIINP v séru se vyskytují při několika maligních onemocněních, např. u karcinomů postihujících játra. U karcinomu prsu s kostními metastázami mohou změny v hladinách PIIINP sloužit jako indikátor odezvy na terapii. U ovariálního karcinomu jsou sérové hladiny PIIINP citlivějším indikátorem reziduálního tumoru než CA125 a změny v hladinách PIIINP rovněž korelují s vývojem choroby.

Koncentrace PIIINP v séru odráží proces hojení po infarktu myokardu a předpovídá funkčnost levé komory a objemové změny. Byla také prokázána souvislost s hojením jizev, s disfunkcí levé komory a mírou přežití. Zvýšení hladiny PIIINP v séru do 4 dnů po infarktu ukazuje, že je hladina vyšší u pacientů se špatnou odezvou na léčbu. PIIINP má také hodnotu prognostického ukazatele úmrtí nebo nutnosti hospitalizace.

PRINCIP TESTU

UniQ PIIINP RIA test je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy. Známé množství značeného PIIINP a neznámé množství neznačeného PIIINP soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky. Po separaci volného antigenu je množství značeného PIIINP ve zkumavce nepřímo úměrné množství PIIINP ve vzorku. Koncentrace v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

REAGENCIE

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
PIIINP RIA TRACER: RADIOINDIKÁTOR PIIINP RIA: Připraven k použití. Radioindikátorem je [¹²⁵ I]- značený PIIINP v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ a červené barvivo.	1 lahvička 22 ml Radioaktivita <200kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
PIIINP RIA ANTISERUM: ANTISÉRUM PIIINP RIA: Připraveno k použití. Králičí antisérum v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ a modré barvivo.	1 lahvička 22 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
PIIINP RIA CALIBRATORS: KALIBRÁTORY PIIINP RIA: Připraveny k použití. Koncentrace PIIINP 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 a 50 µg/l v lidském séru. NaN ₃ . <i>Kalibrováno proti interní master kalibrační soupravě</i>	7 lahviček 1,5 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
PIIINP RIA CONTROL: PIIINP RIA KONTROL: Lyofilizované lidské sérum. NaN ₃ . Očekávané hodnoty jsou uvedeny na zvláštním listě.	1 lahvička Rekonstituovat 1,5 ml destilované vody	Při teplotě 2 – 8°C 5 týdnů po rekonstituci. Delší skladování při teplotě -20°C . Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.
PROCOLLAGEN SEPARATION REAGENT: PROKOLAGENOVÁ SEPARAČNÍ REAGENCIE: Připravena k použití. Separační reagent je suspenze sekundární protilátky kovalentně vázané k pevné fázi. NaN ₃ .	1 lahvička 60 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.

Reagencie obsahují azid sodný jako konzervační činidlo, čtěte laskavě „Upozornění a varování“.

Upozornění a varování

VAROVÁNÍ 1: Pro diagnostické použití *in vitro*.

Není určeno pro interní nebo externí použití u lidí nebo u zvířat. Používejte pouze součásti jedné soupravy. Nemíchejte součásti s navázanou protilátkou z různých souprav (šarží). Reagencie nepoužívejte po expirační době soupravy.

Nepipetujte ústy. Při práci s radioaktivním materiálem je zakázáno jíst, pít nebo kouřit. Používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Po skončení práce s těmito látkami si důkladně umyjte ruce. Ukápnutý materiál je nutno okamžitě omýt velkým množstvím vody.

Materiály použité k čištění by měly být likvidovány dle místních předpisů.

VAROVÁNÍ 2: Souprava obsahuje ^{125}I (poločas rozpadu $T_{1/2}$ 60 dní) emitující 35,5 keV gama záření a 27 - 32 keV rentgenového záření.

Radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracoviště, která splňují ustanovení zákona 18/1997 Sb. v platném znění a příslušných vyhlášek Ministerstva zdravotnictví.

Při práci s radioaktivním materiálem dodržujte následující pravidla:

- všechny radioaktivní materiály skladujte v původním balení a jen na místech k tomu určených, s radioaktivním materiálem pracujte pouze ve schválených prostorách
- příjem a spotřebu radioaktivních látek evidujte
- povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, pravidelně kontrolujte
- ukápnutý radioaktivní materiál je nutno okamžitě utřít a kontaminované čisticí materiály umístit do sběrné nádoby pro radioaktivní odpad, potřísněné povrchy vyčistěte příslušným dekontaminantem (čištění je možno usnadnit překrytím pracovní plochy jednorázovým absorbčním materiálem)
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami, musí být před dalším použitím řádně dekontaminováno a proměřeno.
- radioaktivní materiál, určený do odpadu, musí být likvidován v souladu s platnými právními předpisy v daném státě.

VAROVÁNÍ 3: Se všemi vzorky pacientů je nutno pracovat jako s **potenciálně infekčním** materiálem. Výchozím materiálem pro kalibrátory a kontroly je lidská krev, která byla testována licencovanými reagencemi a shledána negativní na HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátky. Vzhledem k tomu, že žádný známý test nemůže dát jistotu, že materiál není infekční, pracujte s ním jako s materiálem potenciálně infekčním.

VAROVÁNÍ 4: Reagencie obsahují **azid sodný (NaN₃)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azidu sodného, který je v této koncentraci škodlivý při vdechnutí, polknutí a při kontaktu s kůží. Proloužením expozice se zvyšuje nebezpečí vážného poškození zdraví. Po rekonstituci obsahují kalibrátory < 0,1% azidu sodného, což se za škodlivou koncentraci nepovažuje.

Azid sodný může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za tvorby vysoce explozivních azidů příslušných kovů. Jako prevenci tvorby a usazování azidů v potrubí opláchněte vše před likvidací velkým množstvím vody. Navíc by mělo být kovové potrubí opláchnuto také 10% hydroxidem sodným. Při kontaktu s kyselinami tvoří NaN₃ toxické výpary.

PŘÍSTROJE

K měření lze použít jakýkoliv gama čítač schopný měření ¹²⁵I. Účinnost měření by měla být pravidelně kontrolována, stejně tak i proměřováno pozadí. Doporučuje se systematická kalibrace přístroje. Podrobnosti týkající se zapojení, použití, údržby a kalibrace najdete v návodu k obsluze dodávaného výrobcem přístroje.

MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU

Používejte sérum, asepticky odeberte venózní krev za dodržení běžných bezpečnostních opatření.

Vzorky sér se mohou skladovat až 5 dnů při teplotě 2...8°C. Pro dlouhodobější skladování se doporučuje teplota nejméně -20°C. Je třeba vyhnout se opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku.

Vzorky s vysokou koncentrací PIIINP lze ředit pomocí 0,9 % NaCl.

PRACOVNÍ POSTUP

Potřebný materiál, který není součástí soupravy:

MIKROPIPETY pro přesné dávkování 200 μ l, 500 μ l a 1,5 ml

TESTOVACÍ ZKUMAVKY (polypropylen nebo polystyren)

BUNIČITÁ VATA

KRYCÍ FOLIE PARAFILM

VIBRAČNÍ MÍCHADLO

VODNÍ LÁZEŇ s teplotou 37°C

DEKANTOVACÍ STOJÁNEK

CENTRIFUGA s odstředivou silou nejméně 2000 g

GAMA-ČÍTAČ

DESTILOVANÁ VODA

Rekonstituce kontrol

Všechny lahvičky s reagensy, dříve než je otevřete, vytemperujte na pokojovou teplotu (18 - 25°C). Kontroly rekonstituuje přidáním 1,5 ml destilované vody do každé lahvičky. Zavřete víčko a důkladně promíchejte jemným kroužením nebo převrácením, zamezte přitom tvorbě pěny. Před použitím nechte stát 30 minut.

Podrobný popis postupu

1. **Temperujte** všechny reagensy a vzorky na laboratorní teplotu (18 – 25 °C) alespoň 30 minut před použitím.
2. **Označte** sadu zkumavek v duplikátech pro nespecifickou vazbu (NSB), kalibrátory, kontroly, vzorky sér pacientů a pro celkovou aktivitu.
3. Do odpovídajících zkumavek **napipetujte** po 200 μ l kalibrátorů, kontrolních vzorků a vzorků sér pacientů. Do zkumavek pro stanovení nespecifické vazby (NSB) lze pipetovat sérum kteréhokoliv pacienta.
4. Do všech zkumavek **přidejte** 200 μ l radioindikátoru (červený).
5. Do všech zkumavek, kromě NSB a celkové aktivity, **napipetujte** 200 μ l roztoku protilátky (modrý). Do zkumavek určených pro stanovení NSB přidejte 200 μ l destilované vody.
6. Obsah všech zkumavek důkladně **promíchejte** na vibračním míchadle, zkumavky překryjte fólií a **inkubujte** 2 hodiny při 37°C.
7. Separační činidlo nejprve důkladně **promíchejte** šetrným převrácením lahvičky dnem vzhůru a **přidejte** po 500 μ l do všech zkumavek s výjimkou zkumavek s celkovou aktivitou.
8. Obsah zkumavek důkladně **promíchejte** na vibračním míchadle a **inkubujte** dalších 30 minut při laboratorní teplotě (18 – 25 °C).

9. Zkumavky **centrifugujte** 30 minut při nejméně 2000 g při teplotě v rozmezí 4 - 20°C (doporučovaná teplota je 4°C).
10. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **dekantujte**. Jemně klepněte zkumavkami do buničité vaty a ponechte několik vteřin odkapat, aby se odstranil i poslední zbytek kapaliny. Dejte pozor, aby nedošlo k dekantaci precipitátu. **Zkumavky jednou otočené nazpět již znovu dnem vzhůru neotáčejte**. Pokud ve zkumavkách zůstanou zbytky kapaliny, způsobí to rozptýl v hodnotách replikátů a chybné hodnoty.
11. **Změřte** radioaktivitu všech zkumavek pomocí gamma-čítače po dobu alespoň 1 minuty nebo po akumulaci 10 000 impulsů/zkumavku.

OMEZENÍ METODY

Měření PIIINP by nemělo být jediným parametrem pro stanovení diagnózy a léčby, ale mělo by být podpořeno dalšími klinicky relevantními daty.

ZAJIŠTĚNÍ JAKOSTI

Všem klinickým laboratořím je v rámci interního programu zajišťování jakosti doporučováno provádět kontrolu postupu stanovením kontrolních vzorků v hodnotách koncentrací při horní i při dolní hranici kalibrační křivky. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní přijatelný rozsah vnitřních kontrol používaných v dané laboratoři. Střední hodnota rozsahu kontrolních vzorků má spadat do přijatelného rozsahu uváděného výrobcem. Pro stanovení hodnot kontrolních vzorků se doporučuje použít soupravy nejméně ze dvou různých šarží.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Při automatickém výpočtu výsledků doporučujeme použít spline funkci. Výsledky lze odečíst manuálně z kalibrační křivky vynesené v semilogaritmických souřadnicích.

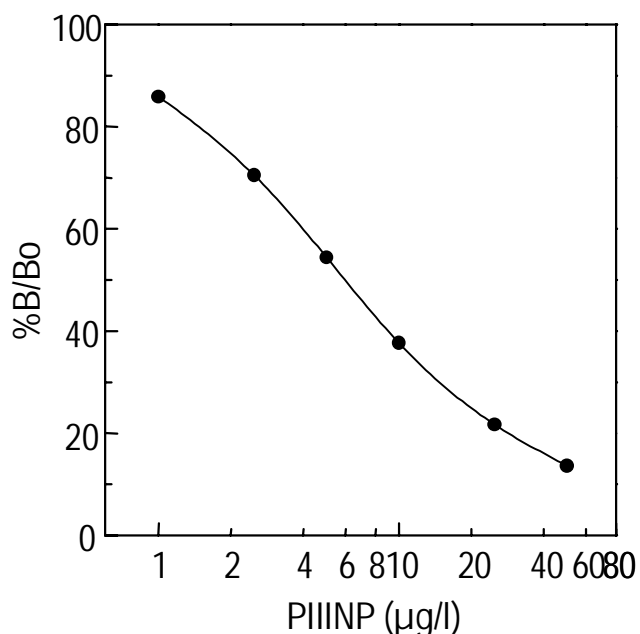
Vypočtete střední hodnotu impulsů pro všechny kalibrátory, vzorky a kontroly.

Vypočtete % (B/B₀) podle vzorce

$$\% (B/B_0) = \frac{(\text{četnost kalibrátoru nebo vzorku} - \text{NSB}) \times 100}{(\text{četnost nulového kalibrátoru} - \text{NSB})}$$

Vyneste kalibrační křivku na semilogaritmický papír z hodnot % (B/B₀) na ose **y** a odpovídajících koncentrací PIIINP (μg/l) na ose **x**.

Odečtete koncentrace PIIINP v neznámých vzorcích z kalibrační křivky.



Zkumavka	Průměr cpm	cpm-NSB	%B/B ₀	PIIINP (μg/l)
Celková aktivita	48807			
NSB	679			
Kal. 0	30976	30297		
Kal. 1,0	26705	26026	85.9	
Kal. 2,5	22047	21368	70.5	
Kal. 5,0	17163	16484	54.4	
Kal. 10	12100	11421	37.7	
Kal. 25	7241	6562	21.7	
Kal. 50	4795	4116	13.6	
Neznámý vzorek 1	17342	16663	55.0	4.9
Neznámý vzorek 2	8468	7789	25.7	19.0

Obr. 1

Typická kalibrační křivka. Příklad.

(str. 11 originální příbalové informace)

Tabulka 1 Výpočet výsledků při použití typických údajů. Příklad.

REFERENČNÍ HODNOTY

Z důvodů etnické, dietární a věkové variability nemusí tyto referenční hodnoty odpovídat celé populaci. Každá laboratoř by si proto měla vytvořit vlastní rozmezí referenčních hodnot.

Referenční hodnoty sérových hladin PIIINP byly vypočítány pro zdravé dospělé osoby na základě vzorků krve zjevně zdravých dospělých osob ve věku 19-65 let. Ke kalkulaci intervalů pro dolní a horní mez bylo použito neparametrické metody doporučené IFCC.

Tabulka 2 Referenční hodnoty hladin PIIINP v séru

	Dospělí
Počet sledovaných osob	232
Průměr	3.7 µg/l
Referenční interval*	2.3 - 6.4 µg/l
0,90 intervaly spolehlivosti	
pro dolní referenční mez	1.9 - 2.6 µg/l
pro horní referenční mez	5.5 - 6.7 µg/l

* Referenční interval = 0,025 a 0,975 fraktilů.

Referenční hodnoty u dětí byly naměřeny u zdravých dětí ve věku 0-19 let (modifikováno dle Trivendi P a kol. J. Pediatr 1989; 114:225-230).

Tabulka 3 Referenční hodnoty u dětí

Věková skupina		Dívky (µg/l)		Chlapci (µg/l)
1 - 3 měsíce	4	53,22 ± 10,87	5	62,05 ± 15,59
3 - 6 měsíců	5	31,25 ± 6,53	13	33,94 ± 9,35
6 - 9 měsíců	7	19,71 ± 3,53	4	18,14 ± 3,26
9 - 12 měsíců	3	19,88 ± 6,16	4	15,25 ± 4,65
1 - 2 roky	9	13,45 ± 2,25	7	11,71 ± 4,30
2 - 3 roky	10	9,85 ± 2,65	9	8,47 ± 2,53
3 - 10 let*	63	7,75 ± 2,17	79	7,75 ± 2,18
10 - 11 let	7	8,02 ± 2,56	12	7,78 ± 1,61
11 - 12 let	12	11,23 ± 2,99	9	7,27 ± 2,15
12 - 13 let	5	10,85 ± 3,77	6	8,96 ± 2,94
13 - 14 let	2	5,84 ± 2,86	4	13,25 ± 5,58
14 - 15 let	5	8,09 ± 1,57	2	12,92 ± 4,10
15 - 16 let	2	7,34 ± 0,11	7	15,42 ± 4,28
16 - 17 let	3	3,98 ± 0,99	-	-
17 - 18 let	4	4,07 ± 1,08	5	4,88 ± 1,06

* Signifikantní změny ve věku 3-10 let nebyly pozorovány.

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Níže uvedené výsledky byly získány v Orion Diagnostica a představují typická analytická data.

Měřicí rozmezí

1,0 – 50 µg/l.

Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnoty nulového kalibrátoru, je přibližně 0,3 µg/l.

Linearita/Linearity

Linearita byla sledovaná zředěním 5 vzorků séra nulovým kalibrátorem (0 µg/l). Průměrný výtěžek ze vzorků byl 91 %.

Metoda standardního přídávku

Metoda standardního přídávku (recovery) známá množství PIIINP byla přidána k šesti patientským sérum obsahujícím 3,4 µg/l PIIINP. Standardní přídávky se pohybovaly v rozmezí $94,0 \pm 6,0$ % s průměrnou hodnotou 94%.

Přesnost

Pro stanovení variací v rámci testu (intra-assay) a mezi testy (inter-assay) byly testovány vzorky o různých koncentracích PIIINP.

Tabulka 4. Intra-assay/ inter-assay přesnost

Intra-assay přesnost 16 replikátů			Inter-assay přesnost 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (µg/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (µg/l)	CV (%)
1	2.8	3.0	4	2.7	6.5
2	6.6	7.0	5	6.8	4.5
3	11.9	4.1	6	12.2	7.2

Interferující látky

Sérový bilirubin do koncentrace < 400 µmol/l, hemoglobin do koncentrace < 5 g/l a triglyceridy do koncentrace < 30 g/l neinterferují s měřením PIIINP.

Specificita

Intaktní UniQ PIIINP RIA kit není citlivý k pomalu odbourávaným složkám nacházejících se v krvi. Měří propeptid a jeho formy o vyšší molekulové hmotnosti. UniQ PIIINP RIA zkříženě nereaguje s antigeny použitými v soupravách UniQ PINP RIA.

UniQ PIIINP RIA

Kat.č. 68570

Obsah soupravy (100 testů)

PIIINP RIA tracer: PIIINP RIA RADIOINDIKÁTOR

PIIINP RIA antiserum: PIIINP RIA ANTISÉRUM

PIIINP RIA calibrators: PIIINP RIA KALIBRÁTORY

PIIINP RIA control: PIIINP RIA KONTROL

Procollagen separation reagent: PROKOLAGENOVÁ SEPARAČNÍ REAGENCIE

Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v µl)

	Celková aktivita	NSB	Kalibrátor	Kontrolní sérum
Napipetujte vzorek		200	200	200
Napipetujte radioindikátor (červený)	200	200	200	200
Napipetujte antisérum (modré)			200	200
Napipetujte destilovanou vodu		200		
Míchejte		x	x	x
Inkubujte 2 hodiny při 37°C		x	x	x
Napipetujte separační reagentii		500	500	500
Promíchejte		x	x	x
Inkubujte 30 min. při pokojové teplotě		x	x	x
Centrifugujte 15 minut při 2000 g		x	x	x
Dekantujte		x	x	x
Měřte 1 min nebo 10 000 impulzů	x	x	x	x

UniQ® je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy.

132032-CZ09

Sídlo výrobce v ČR (zastoupení pro ČR, HU, PL a SR):

Orion Diagnostica-organizační složka
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6
Tel. +420 233 350 533, Fax:+420 233 350 532
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz
www.oriondiagnostica.cz