

CA15-3 [I-125] IRMA készlet

(REF: RK-153CT és RK-153CT50)

A CA15-3 IRMA készlet humán szérumban CA15-3 tumor-asszociált antigén tartalmának *in vitro* direkt meghatározására szolgál, a 0 - 300 U/mL mérési tartományban. A készlet 100 ill. 50 meghatározásra elegendő bevont csövet tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 (RK-153CT) ill. 17 (RK-153CT50) minta CA15-3 koncentrációja határozható meg.

Bevezetés

A CA15-3 a MUC-1 gén által kódolt, nagy molekulatömegű, mucin típusú glikoprotein. A CA15-3 antigén két monoklonális antitest segítségével detektálható: DF3 és 115D8. A DF3 antitestet egy emlőrák dúsított sejtmembrán extraktuma ellen (Kufe et al., Hybridoma 1984;3(3):223-232), a 115D8 antitestet pedig humán tej zsírcsepp membrán antigénjei ellen készítették (Hilkens et al., Prot Biol fluids 1981;29:813-816).

Magas CA 15-3 szérumban koncentrációk gyakran fordulnak elő emlőrákos betegekben, értéke korrelál a klinikai státusszal. Szintje más daganatos betegségekben is emelkedhet, mint a petefészek- és tüdőrákban. Néhány jóindulatú betegség esetén (pl. endometriosis, alhasi gyulladás, májgyulladás) valamint fiziológiás állapotban (pl. terhesség, szoptatás alatt) is emelkedhet a CA15-3 szérumszint.

Mivel a CA15-3 kimutatása nem elég specifikus és szenzitív a betegség korai időszakában, populáció szűrésére nem alkalmas. Klinikai jelentősége leginkább az emlőrák differenciál-diagnosztikájában, a prognózis megítélésében, a kezelés monitorozásában, az első vonalbeli terápia utáni recidívák korai felismerésében és a remisszióban lévő betegek hosszú távú nyomon-követésében rejlik.

A mérés elve

Jelen készletben az IRMA azon változatát alkalmazzuk, amelyben a standardokban, illetve a mintákban lévő antigén koncentrációját két lépésben határozzuk meg. Az első lépésben a CA15-3 antigén a specifikus biotinál konjugált, ún. capture antitesttel (115D8*) immunokomplexet hoz létre, mely az inkubáció során a sztreptavidinnal bevont kémcső felületén kötődik meg. A reakció lejátszódása után a csöveket kimossuk, ezzel eltávolítva a fölös reagenseket. Ezt követően ¹²⁵I jelzett antitestet (DF3*) adunk a csövekhez, mely a második inkubáció során hozzákötődik az antigén szabadon maradt kötőhelyeihez, így kialakítva a szendvicsnek nevezett immunokomplexet. A második reakciólépést követő mosás után gamma számlálóval mérjük a radioaktivitást. A kémcsővekben mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő CA15-3 koncentrációjával. Az ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbéről az ismeretlen minták koncentrációit visszaolvassuk.

*lásd. jogi figyelmeztetés!

A készlet tartalma

- 1 flakon ¹²⁵I-TRACER (21 mL), használatra kész pufferes oldat, radioaktivitása <980 kBq, piros festéket és 0,1 % NaN₃-t tartalmaz.
- 1 flakon ANTISZÉRUM (21 mL), használatra kész pufferes oldat, kék festéket és 0,1 % NaN₃-t tartalmaz.
- 1 flakon HÍGÍTÓ (10 mL), felhasználásra kész, pufferes ló szérumban oldat 0,1 % NaN₃ tartósítóval.
- 6 üveg STANDARD (6 x 0,5 mL), felhasználásra kész, humán szérumban és 0,1% NaN₃-t tartalmaz. A standardok koncentrációját a minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.
- 2 üveg ELLENŐRZŐ SZÉRUM (2 x 0,5 mL), CI-CII, felhasználásra kész, humán szérumban és 0,1% NaN₃-t tartalmaz. Koncentrációját a minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.
- RK-153CT:** 2 doboz BEVONT CSŐ, 2x50 db, **RK-153CT50:** 1 doboz BEVONT CSŐ, 1x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban.
- 1 flakon MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM, (40 ml), 0,2 % NaN₃ tartósítóval, 1400 mL desztillált vízzel hígítandó

1 db Minőségellenőrzési bizonylat

1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, rugalmas kémcsőrogzító kiképzésben; 10 µL pipetta eldobható műanyag hegyekkel; ismétlő pipetta (0,2 mL térfogatra); 1 literes folyadéküveges leosztó (diszpenzer) 2 mL térfogatra, rázógép; kémcsőzáró műanyag fólia; papírvatta vagy itatópapír; gamma-számláló

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

Amennyiben a CA15-3 meghatározás a mintavételt követő 24 órán belül megtörténik, a mintákat 2-8°C-on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on fagyaszttva tartjuk. Kerüljük a minták ismételt visszafagyaszttását! Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumban ne használjunk mérésre. A 300 U/mL-nél magasabb koncentrációjú mintákat a hígítóval (DIL) történő hígítása után ismételt mérjük meg. Ajánlott a 10-szeres hígítás (450 µL DIL + 50 µL minta).

A reagensek előkészítése, tárolása

A mosóoldat koncentrátumot öntsük hozzá 1400 mL desztillált vízhez. A hígított mosóoldatot 2-8°C -on tároljuk a készlet lejárataig.

A készlet többi komponense az első felnyitást követően 2-8°C -on tárolható a készlet lejárati idején belül. A pontos lejárati idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve.

FIGYELEM!

A mérés megkezdése előtt a reagens oldatokat illetve a mérendő mintákat engedjük szobahőmérsékletre melegedni és alaposan homogenizáljuk. Kerüljük el a habzást.

A meghatározás menete

(ld. Folyamatábra, 1. Táblázat)

- Jelöljük meg két-két csövet: standard (S0-S5), ellenőrző szérumban (CI, CII); vizsgálandó minták (Mx). A totál beütésszám (T) mérésére két nem bevont csövet célszerű feliratozni.
- Mérjük 10 µL standardot, ill. ellenőrző szérumban és szérumban mintát a megfelelő csövekbe.
- Mérjük minden csőbe 200 µL antiszérumban oldatot (kivéve T).
- Helyezzük a csöveket rögzítős kémcsőtartó állványba. Állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi kémcsőben mozgásban legyen. Kevertessük 1 órán át szobahőmérsékleten (min. 600 rpm).
- Adjunk minden csőhöz 2 mL mosópuffert, majd a csőtartót fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a folyadékot, majd változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!), tegyük a csőtartót papírvattára 2 percig.
- Ismételjük meg kétszer a mosási lépést az 5. pontnak megfelelően.
- Mérjük minden csőbe 200 µL tracer oldatot.
- A 4. ponthoz hasonlóan kevertessük 1 órán át szobahőmérsékleten.
- Mossuk a csöveket az 5-6 pontban leírtak szerint.
- Mérjük meg a csövek radioaktivitását 60 másodpercig gamma-számlálóval és számítsuk ki az eredményeket az alábbiak szerint.

1.Táblázat Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	Totál	Standard	Ellenőrző szérumban	Minta
Standard		10		
Ellenőrző szérumban			10	
Minta				10
Antiszérumban		200	200	200
Kevertetés 1 órán át szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itató papíron				
Mosási lépés ismétlése 2-szer				
Tracer	200	200	200	200
Kevertetés 1 órán át szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itató papíron				
Mosási lépés ismétlése 2-szer				
Radioaktivitás mérés (min. 60 sec/cső)				
Adatfeldolgozás				

Az eredmények számítása

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét. Log-log papíron ábrázoljuk a standard koncentrációkhoz tartozó átlag cpm értékeket. Olvassuk le a mérendő minták koncentrációit a standard görbéről az átlag cpm értékek alapján.

Egyes adat-kiértékelésekhez, rendszerint minőségellenőrzési célból, szükség lehet a specifikus kötési értékekre. Erre a B/T értékek használhatók, amelyek számításához a standardok, illetve minták értékeit osztjuk a totál aktivitással az alábbi egyenlet szerint:

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

A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez speciálisan immunometrikus assay-re kifejlesztett spline illesztő program használatát javasoljuk.

2. Táblázat Jellemző mérési eredmények

Csővek	Átlag 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

Minőségi jellemzők

Specifititás

A készletben használt antitestek garantálják a CA15-3-ra teljesen specifikus mérést.

Érzékenység

120 meghatározás alapján (60 nulla standard és 60 alacsony koncentrációjú minta) és 95% valószínűséggel, a mérés határai:

Limit of Blank (LoB): 0,24 U/mL

Limit of Detection (LoD): 1,35 U/mL

Eredmény közlés szempontjából: ha a mérési eredmény az LoB alatt van, a mintában nem detektálható a CA15-3. Ha az eredmény az LoB és LoD között van, a CA15-3 detektálható, koncentrációja < 1,35 U/mL.

Pontosság

Az intra-assay pontosságot 20 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 15 független mérésben határoztuk meg, 4 humán szérumból segítségével.

Intra-assay		Inter-assay	
Átlag (U/mL)	CV%	Átlag (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

Hígítási teszt

Öt egyedi, 200-300 U/mL közötti humán szérumból hígítottuk tízszeresére gravimetriчески a készlet hígítójával. A hígítás utáni visszanyerés eredménye az egyes mintákra 83,9%, 85,6%, 84,1%, 92,1% és 90,6% volt.

Visszanyerési teszt ("recovery")

A mérés során 5 db egyedi humán szérumból mintába ismert mennyiségű CA15-3-t vittünk be három különböző koncentrációban és vizsgáltuk a kiindulási és a megemelkedett koncentráció szinteket. Az átlag visszanyerés 105,9% volt (104% – 108%).

Nagy-dózisú Hook effektus

Az effektus 7500 U/mL alatt nem jelentkezik.

Várható referens tartomány

A megadott referens tartomány csak tájékoztató adatnak tekintendő, és nem helyettesítheti a készletet felhasználó laboratóriumok saját területükre jellemző normálértékének megállapítását.

Vélhetően egészséges, véradós női szérumból vizsgálat alapján a következő eredményeket kaptuk:

Összes minta	295
Átlag (U/mL)	14,67
Medián (U/mL)	14,24
Minták < 30 U/mL	294 (99,7%)
Minták < 25 U/mL	287 (97,3%)

Összehasonlító mérés

Összehasonlítottuk az RK-153CT IRMA-t (Y) az IBA-CIS CA15-3 IRMA (X) módszerrel 172 db, 5 – 300 U/mL közötti minta mérésével. A következő lineáris összefüggést találtuk a két módszer között:

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

Megjegyzések, tanácsok

1) A különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó CA15-3 készletének komponenseivel.

2) **Figyelem, hibaforrás!** Kevertetésre csak olyan kémcsőtartó használható, amelyben a csövek rögzítve vannak. "Lötyögős" állványban a kémcsövek tartalma egyáltalán nem, vagy egyenetlenül keveredik, annak ellenére, hogy maga az állvány, és a kémcső mozgásban van. Egyetlen, illetve tökéletlen keverés teljesen hamis (fals alacsony!) mérési eredményekhez vezethet!

Az assay korlátai

- A CA15-3 meghatározás nem használható az emlőrák szűrésére.
- 30 U/mL feletti értékek előfordulhatnak jóindulatú betegségekben is.
- A CA15-3 30 U/mL alatti koncentrációja nem zárja ki a reziduális daganatot.
- A mérési eredmények csak a vonatkozó klinikai eredményekkel együtt használhatók fel.
- Az olyan betegekből származó minták, akik diagnosztikai vagy terápiás célokra kaptak valamilyen egér immunglobulin készítményt, humán anti-egér antitesteket (HAMA) tartalmazhatnak. Ezek a minták hibás eredményeket okozhatnak.

Biztonsági óvrendszabályok

Radioaktivitás

A készlet radioaktív anyagot tartalmaz. A felhasználó laboratóriumok felelőssége, hogy munkájuk során, ill. a védőcsomagolás esetleges sérülése esetén a radioaktív anyagok tárolására, felhasználására, és kezelésére vonatkozó törvényi szabályozás és hatósági előírások szerint járjanak el.










Fertőzésveszély

A kitben levő humán szérumból tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérumból HIV(1/2) antitest, HBsAg antigén, Hepatitisz-C antitest és Treponema antitest vizsgálatra negatív eredményt adott. Ennek ellenére a humán szérumból tartalmazó komponenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni, és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani.

Minden állati terméket és származékot egészséges állatokból nyerték. Mindezek ellenére az állati eredetű komponenseket tartalmazó reagensteket potenciálisan fertőzőként kell kezelni!

Mérgező anyagok

A készlet egyes komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 136 mg. A nátrium-azid nemcsak mérgező anyag, de belőle rézzel, vagy ólommal érintkezve robbanásveszélyes azidok is keletkezhetnek. A mérgezés a laboratóriumi munkák általános biztonsági előírásainak betartásával kerülhető el. A nehézfém-azidok keletkezésének megakadályozására a nem-radioaktív hulladék reagensteket nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatornahálózatba.

	Lejárati idő	CONTROL	Kontrol
	Gyártási szám	CAL	Standard
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok	CT	Bevont cső
	Biológiai veszély	TRAC	Tracer
	Lásd használati utasítás	AS	Antiszérumból
	In vitro diagnosztikai eszköz	WASHB	Mosópuffer
	Gyártó		Radioaktív anyag
REF	Katalógus szám		2-8°C-on tárolandó



Website: <http://www.izotop.hu>

Technical e-mail: immuno@izotop.hu

Commercial e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: (36-1)392-2577, Fax: (36-1)395-9247

Jogi figyelmeztetés

A CA15-3[®] a Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI) védjegye. Jelen CA15-3 IRMA készlet az DF3 és 115D8 monoklonális antitestek használatán alapszik, amelyek kizárólag az FDI és forgalmazóján keresztül elérhetők.

