

CA72-4 [¹²⁵I] IRMA készlet

(REF: RK-724CT és RK-724CT50)

A CA72-4 IRMA készlet humán szérumban TAG-72 (tumor-asszociált glikoprotein 72) tartalmának *in vitro* direkt meghatározására szolgál, a 3 - 100 U/mL mérési tartományban. A készlet 100 ill. 50 meghatározásra elegendő bevont csövet tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 44 (RK-724CT) ill. 19 (RK-724CT50) minta CA72-4 koncentrációja határozható meg.

Bevezetés

A TAG-72 (más néven CA72-4) egy nagy molekulatömegű, mucin típusú glikoprotein, amely a gasztrointesztinális rendszer rosszindulatú daganataiban képződik. Ezt a tumor markert eredetileg a B72.3 monoklonális antitest segítségével mutatták ki (Colcher és mtsai, 1981). A tisztított antigénnel való immunizálással második generációs antitesteket fejlesztettek ki, amelyek közül a CC49 monoklonális antitestet választottak immunradiometrikus assay fejlesztésére (Gero és mtsai, 1989). A két antitest más-más kötőhelyet (epitopot) ismer fel a molekula szerkezetében.

A CA72-4 meghatározás klinikai jelentősége leginkább a gyomorrák diagnosztikájában, a kezelés monitorozásában, a recidívák korai felismerésében és a betegség hosszú-távú nyomon követésében rejlik. Mivel a CA72-4 kimutatása nem elég specifikus és szenzitív a betegség korai időszakában, populáció szűrésére nem alkalmas.

Magas TAG-72 koncentrációt mérhetünk még a petefészek, emlő, hasnyálmirigy, vastagbél, húgyhólyag, méhnyak és endometrium karcinómák néhány esetében is.

A mérés elve

A készlet működése a szilárd fázisú immunoradiometrikus assay (IRMA) elvén alapul. Jelen készletben azon változatát alkalmazzuk, amelyben a standardokban, illetve a mintákban lévő antigén koncentrációját két lépésben határozzuk meg. Az első lépésben a CA72-4 antigén a specifikus biotinnal konjugált, ún. capture antitesttel (CC49*) 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 (B72.3*) 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 kémcsövekben mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő CA72-4 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 (11 mL), használatra kész pufferes oldat, kék festéket és 0,1 % NaN₃-t tartalmaz.
- 1 flakon HÍGÍTÓ (5 mL), felhasználásra kész, pufferes ló szérumban 0,1 % NaN₃ tartósítóval.
- 4 üveg STANDARD (4 x 1 mL), felhasználásra kész, humán szérumban és 0,1% NaN₃-t tartalmaz. Antigen tartalmuk kb. 3-20-50-100 U/mL (S1-S4). A standardok pontos koncentrációját a minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza. *A standard kalibráció a Fujirebio Diagnostics Inc. CA72-4 IRMA módszerrel történt.*
- 2 üveg ELLENŐRZŐ SZÉRUM (2 x 1 mL), CI-CII, felhasználásra kész, humán szérumban és 0,1% NaN₃-t tartalmaz. Koncentrációját a minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.
- RK-724CT:** 2 doboz BEVONT CSŐ, 2x50 db, **RK-724CT50:** 1 doboz BEVONT CSŐ, 1x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban.
- 1 flakon MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM, (40 ml), 0,1 % 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; 100 µL pipetta eldobható műanyag hegyekkel; ismétlő pipetták (0,1 és 0,2 mL térfogatra); 1 literes folyadéküveges leosztó (diszpenzer) 2 mL térfogatra, rázógép; kémcsőzáró műanyag fólia; papírvatta vagy itatóspapír; gamma-számláló

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

Amennyiben a CA72-4 meghatározás a mintavételt követő 24 órán belül megtörténik, a mintákat 2-8°C-on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on fagyaszta tartjuk. Kerüljük a minták ismételt visszafagyasztását!

Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumban ne használjunk mérésre. *A 100 U/mL-nél magasabb koncentrációjú mintákat a hígítóval (H) történő tízszeres hígítás után ismételt mérjük meg. Ajánlott a 10-szeres hígítás (450 µL H + 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 lejáratáig.

A készlet többi komponense az első felnyitást követően 2-8°C -on tárolható a készlet lejáratási idején belül. A pontos lejáratási 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)*

1. Jelöljük meg két-két csövet: standard (S1-S4), ellenőrző szérumban (CI, CII); vizsgálandó minták (Mx). A totál beütésszám (T) mérése két nem bevont csövet célszerű feliratozni.
2. Mérjük 100 µL standardot, ill. ellenőrző szérumban és szérumban mintát a megfelelő csövekbe.
3. Mérjük minden csöbe 100 µl antiszérumban oldatot (kivéve T).
4. Helyezzük a csöveket rögzítős kémcsőtartó állványba. Állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi kémcsőben mozgásban legyen. Kevertessük 2 órán át szobahőmérsékleten (min. 600 rpm).
5. Adjunk minden csövhöz 2 mL mosópuffert, majd a csőtartót fejfel lefelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a folyadékot, majd változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!), tegyük a csőtartót papírvattára 2 percig.
6. Ismételjük meg kétszer a mosási lépést az 5. pontnak megfelelően.
7. Mérjük minden csöbe 200 µl tracer oldatot.
8. Fedjük le a csöveket és inkubáljuk egy éjszakán át (18 - 22 óra) 2 - 8°C-on.
9. Mossuk a csöveket az 5-6 pontban leírtak szerint.
10. 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		100		
Ellenőrző szérumban			100	
Minta				100
Antiszérumban		100	100	100
Kevertetés 2 órán át szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosási lépés ismétlése 2-szer				
Tracer	200	200	200	200
Inkubálás egy éjszakán át 2 - 8°C-on				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
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:

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

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

Tubes	Mean 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

Minőségi jellemzők

Specifitás

A készletben használt antitestek garantálják a CA72-4-re teljesen specifikus mérést.

Érzékenység

120 meghatározás alapján és 95% valószínűséggel, a mérés határai:

Limit of Detection (LoD): 1,94 U/mL

Pontosság

Az intra-assay pontosságot 20 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 22 független mérésben határoztuk meg, 4 humán szérumból segítségével.

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

Hígítási teszt

Négy egyedi humán szérumból hígítottuk tízszer gravimetrikan.

Minták	1	2	3	4
CA72-4 U/mL	71,67	72,78	56,33	76,6
Hígítás	9,76	9,76	9,78	9,76
Várt U/mL	7,34	7,45	5,76	7,85
Mért U/mL	7,81	7,67	5,64	8,01
Mért/várt (%)	106,4	102,9	97,9	102,1

Visszanyerési teszt ("recovery")

A mérés során 5 db egyedi humán szérumból mintába ismert mennyiségű CA72-4-t vittünk be három különböző koncentrációban és vizsgáltuk a kiindulási és a megemelkedett

koncentráció szinteket. Az átlag visszanyerés 101,44% volt (91% – 117%).

Nagy-dózisú Hook effektus

Az effektus 1100 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. Véltően egészséges, véradós szérumból vizsgálatát alapján a következő eredményeket kaptuk:

Minták száma	300 (150 nő – 150 férfi)
Medián (U/mL)	1,47
Átlag (U/mL)	1,77
Szórás (U/mL)	1,94
Minták < 4 U/mL	285 (95,0%)

Összehasonlító mérés

A CA72-4 IRMA-t (y) összehasonlítottuk a Fujirebio Diagnostics Inc. CA72-4 IRMA (x) módszerével 68 db, 3 – 100 U/mL közötti minta mérésével. A következő lineáris összefüggést találtuk a két módszer között:

$$Y = 1,087X - 0,1828 \quad R^2 = 0,9259$$

Megjegyzések, tanácsok

1) A különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó CA72-4 készletének komponenseivel.

2) **Figyelem, hibaforrás!** A bevont kémcsövek nem tartalmaznak külön feliratot. Közönséges kémcsövekkel való összetévesztésük komoly mérési hibákhoz vezethet! Ennek elkerülésére a műanyag dobozból soha ne vegyünk ki többet a szükséges mennyiségnél, illetve a felhasználatlan kémcsöveket azonnal tegyük vissza eredeti tartódobozukba. Ha az összekeverés veszélye a feldolgozás alatt is fennáll, célszerű a bevont csöveket más módon is megjelölni (pl. üvegre író tollal "meggyűrűzni").

3) **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. Egyenetlen, illetve tökéletlen keverés teljesen hamis (fals alacsony!) mérési eredményekhez vezethet!

Az assay korlátai

- A CA72-4 meghatározás nem használható a gyomorrák szűrésére.
- 4 U/mL feletti értékek előfordulhatnak jóindulatú betegségekben is.
- A CA72-4 4 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 használt 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 reagenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni!

Mérgező anyagok

A készlet egyes komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 80 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 reagenseket nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatornahálózatba.

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

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 CA72-4® a Fujirebio Diagnostics Inc. (FDI) védjegye. Jelen CA72-4 IRMA készlet az B72.3 és CC49 monoklonális antitestek használatán alapszik, amelyek kizárólag az FDI és forgalmazóin keresztül elérhetők.

 **FUJIREBIO**
Diagnostics, Inc.