

TSEKKI

Spectria®

TATI RIA

Radioimunoanalytické stanovení,
zkumavky s navázanou protilátkou
Kat.č. 67105

Návod K Použití Soupravy

Leden 2008

Určený účel použití	3
Klinický význam TATI	3
Princip testu	5
Reagencie	6
Přístroje	8
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	8
Pracovní postup	8
Omezení metody	10
Zajištění jakosti	10
Výpočet výsledků	11
Referenční hodnoty	12
Analytické parametry měření	13
Literatura (viz.anglický návod k použití)	



Orion Diagnostica

Výrobce:
Orion Diagnostica Oy
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland
Tel. +358-10-4261
Fax +358-10-426 7546
www.oriondiagnostica.fi



Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický
prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Obsahuje NaN_3



Škodlivé



Xn

Protilátka proti TATI



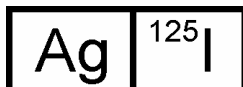
Koncentrace kalibrátoru



Kontrola



Radioindikátor



Promývací roztok



URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Souprava SPECTRIA TATI (tumor-associated trypsin inhibitor) RIA firmy Orion Diagnostica, využívající techniky zkumavek potažených protilátkou, je určena pro kvantitativní radioimunoanalytické *in vitro* měření koncentrace TATI v séru a moči.

KLINICKÝ VÝZNAM TATI

Tumor – associated trypsin inhibitor (TATI) je 6 kD velký protein, který byl původně identifikován imunochemickou metodou v moči pacientky s karcinomem vaječníku. Cystická tekutina mucinózního nádoru vaječníku obsahuje TATI ve velkých koncentracích. TATI specificky inhibuje trypsin a akrosin, ale ne proteázy asociované s koagulací a fibrinolýzou. TATI je identický s pankreatickým sekrečním inhibitorem trypsinu (PSTI), role obou je zaměřena na inhibici předčasně aktivovaného trypsinu ve slinivce. V mnoha nádorech je TATI vylučován společně s trypsinem asociovaným s tumorem. Kromě toho je TATI ještě v nízkých koncentracích vytvářen v některých extrapancreatických tkáních, sérové hladiny TATI nejsou redukovány u pacientů s částečně odstraněnou slinivkou břišní. To ukazuje na to, že TATI v séru zdravých jedinců a pacientů s karcinomem pocházejí ze slinivky břišní a dalších orgánů.

TATI je volně filtrován přes glomeruly a částečně reabsorbován v tubulech. Normálně jsou hodnoty TATI v moči asi 2-3krát vyšší než v séru, ale násobky se mohou lišit v závislosti na rychlosti močové exkrece. Proto je nutné přepočítat koncentraci TATI v moči na kreatinin. Měření TATI v moči lze použít jako alternativu k měření TATI v séru při monitorování nádoru, ale kolísání jeho koncentrace v moči v jednotlivých dnech je větší než v séru.

Karcinom vaječníku

TATI je citlivý marker pro mucinózní karcinom vaječníku. Jeho hodnoty stoupají o cca 50 % v I. stadiu choroby a o 80-90 % ve IV. stadiu. I když TATI u nemukózních karcinomů vaječníku je méně často zvýšený, je to ukazatel špatné prognózy u pacientek s tímto karcinomem. Objevuje se společně s vylučováním trypsinu asociovaného s karcinomem.

Karcinom ledvin

Nedávno bylo objeveno, že koncentrace TATI v séru u pacientů s karcinomem ledvin vzrůstají, incidence se pohybuje od 20 % u stádia I až po 60 % u stádia IV. To ukazuje, že TATI je v současnosti nejcitlivější dostupný ukazatel pro tento druh karcinomu.

Karcinom močového měchýře

Zvýšené sériové koncentrace TATI se objeví u 20-60 % pacientů s karcinomem močového měchýře. Ve studii 7 různých markerů byl TATI nalezen jako nejcitlivější a specifický marker pro toto onemocnění. Nedávno publikované výsledky dále ukazují, že TATI je také prognostický marker pro tuto chorobu.

Další karcinomy

Zvýšené koncentrace TATI v séru se objevují u různých druhů karcinomů. U karcinomu slinivky břišní je koncentrace zvýšena asi u 70-90 % pacientů, zřejmě jako výsledek pronikání PSTI z nemocného pankreasu. Zvýšené hodnoty TATI jsou často způsobené pankreatitidou. Zvýšené sérové koncentrace TATI se objevují i u 30-40 % pacientů s karcinomem jater nebo žlučníku, také u karcinomu žaludku nebo střev, u 30-50 % pacientů s karcinomem děložního čípku, endometria, prsu a plic.

Monitorování karcinomů pomocí TATI

Změny v sérových hladinách a stupni exkrece TATI odráží vývoj nemoci. Pro monitorování karcinomu jsou nejspolehlivější měření ze séra. Výrazně zvýšené hodnoty jsou obvykle spojovány s progresivní nemocí.

TATI u nemaligních onemocnění

Zvýšené koncentrace TATI v séru a moči se mohou objevovat ve spojitosti s nemaligními poruchami a často také u některých zánětlivých chorob. I když vliv slabého zánětu na koncentraci TATI je malý. U pacientek se zánětlivými gynekologickými chorobami se zvýšené hladiny TATI objevují jen, když koncentrace CRP jsou vyšší než 100 mg/l. U pankreatitidy jsou zvýšené hladiny TATI časté vzhledem k vylučování PSTI z pankreatu. Žlučové obstrukce také na přechodnou dobu hladiny sérové TATI zvýší, přičemž nejvyšší hodnota je druhý pooperační den. Koncentrace klesá do 5-7 dní. Protože je TATI vylučován převážně renální exkrecí, sérové hladiny TATI se zvyšují při renální insuficienci a u dialyzovaných pacientů. Za těchto podmínek jsou hladiny TATI silně zvýšené, tj. v rozmezí 400-800 µg/l.

PRINCIP TESTU

Spectria TATI test je založen na široce používané technice kompetitivní radioanalýzy, u které je použita separační technologie zkumavek potažených protilátkou. Vzorek obsahující neznámé množství testované látky (neznačený antigen) je přidán ke standardnímu množství značeného derivátu téže látky (značený antigen). Značený a neznačený antigen soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky. Po vymytí volného antigenu je množství navázaného značeného antigenu na zkumavce nepřímo úměrné koncentraci neznačeného antigenu. Aktuální koncentrace TATI v neznámém vzorku se získá odečtením z kalibrační křivky.

REAGENCIE

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
TATI COATED TUBES: ZKUMAVKY S NAVÁZANOU PROTILÁTKOU PROTI TATI: Geometricky optimalizované testovací zkumavky potažené sekundární protilátkou proti TATI.	100 ks v plastové krabičce	Při 2 - 8°C v původním obalu do data expirace. <i>K analýze vezměte pouze nezbytně nutné množství zkumavek. Krabičku skladujte v uzavíracím plastovém sáčku společně se silika gelem.</i>
TATI TRACER: RADIOINDIKÁTOR TATI: Připraven k použití. Radioindikátorem je [¹²⁵ I]- značený TATI v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ a červené barvivo	1 lahvička 22 ml Radioaktivita <200 kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
TATI ANTISERUM: ROZTOK MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI TATI: Připraven k použití. Monoklonální protilátka proti TATI v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ a modré barvivo.	1 lahvička 22 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
TATI CALIBRATORS: KALIBRÁTORY TATI: Připraveny k použití. Koncentrace TATI 0; 5; 15; 45; 150 a 450 µg/l v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ . <i>Kalibrováno proti interní master kalibrační soupravě</i>	6 lahviček 500 µl	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
TATI CONTROLS Low & High: TATI RIA KONTROLY Nízká & Vysoká: Lyofilizované lidské sérum obsahující azid sodný. Očekávané hodnoty jsou uvedeny na zvláštním listě.	2 lahvičky Rekonstituovat 500 µl destilované vody	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Při teplotě 2 – 8°C 4 týdny po rekonstituci.
TATI WASH SOLUTION: TATI PROMÝVACÍ ROZTOK: Připraven k použití. NaN ₃ .	1 lahvička 150 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.

Reagencie obsahují azid sodný, čtěte „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 zkumavky s navázanou protilátkou z různých souprav (krabic). 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 skočení 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 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 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 (NaN_3)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azid sodný, který je v této koncentraci škodlivý při vdechnutí, polknutí a při kontaktu

s kůží. Prodloužením 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 olověnými nebo měděnými uzávěry za tvorby vysoce explozivních azidů příslušných kovů. Jako prevenci tvorby azidů opláchněte uzávěry před likvidací velkým množstvím vody. Výjimečně mohou být kovové uzávěry opláchnuty také 10% hydroxidem sodným. Při kontaktu s kyselinami tvoří NaN_3 toxické výpary.

PŘÍSTROJE

K měření lze použít jakýkoli gamma – čítač schopný detekovat ^{125}I . U přístroje je nutno pravidelně kontrolovat detekční účinnost. Detaily o instalaci, použití, údržbě a kalibraci přístroje zjistíte v návodu k jeho použití.

MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU

Sérum a plazma

Ačkoliv se doporučuje použít jako vzorek sérum, lze použít také vzorky plasmy (heparin, EDTA).

Vzorky je možno uchovávat 48 hodin při teplotě +2...8 °C a delší dobu při teplotě –20 °C. Zabraňte opakovanému rozmražení a zmražení vzorku.

Moč

Pokud používáte vzorky moče, koncentrace TATI v moči by měla být vždy vztažena na koncentraci kreatininu, aby se eliminoval vliv kolísání močové exkrece. Alternativně lze stanovit 24 hodinovou močovou exkreci.

PRACOVNÍ POSTUP

Materiály potřebné, ale nedodávané se soupravou

MIKROPIPETY pro přesné odměření 50 μL , 200 μL a 1000 μL

TESTOVACÍ ZKUMAVKY (pro měření celkové radioaktivity)

VIBRAČNÍ MÍCHADLO

DEKANTOVACÍ STOJÁNEK

BUNIČITÁ VATA

GAMMA-ČÍTAČ

KRYCÍ FÓLIE PARAFILM

DESTILOVANÁ VODA

Rekonstituce kontrolních sér

Před otevřením kontrolních sér vytemperujte lahvičky na laboratorní teplotu. Rekonstituujte je přidáním 500 μL destilované vody. Lahvičky

uzavřete a dobře promíchejte jemným kroužením nebo inverzí, abyste zabránili tvorbě pěny. Před použitím nechte alespoň 60 minut stát.

Pracovní postup

1. Všechny reagensy, vzorky a kontroly **vytemperujte** na laboratorní teplotu.
2. **Označte** zkumavky s navázanou protilátkou štítky pro kalibrátory TATI, kontrolní séra (nízké, vysoké) a patientská séra. Pokud používáte, připravte zkumavky pro NSB. Pracujte v duplikátech. Odděleně připravte dvě normální zkumavky pro měření celkové radioaktivity.
3. **Napipetujte** 50 µl kalibrátorů, kontrolních a patientských sér do příslušných zkumavek. Napipetujte jakékoli patientské sérum do NSB zkumavky. Zkumavky pro měření celkové radioaktivity ponechte zatím prázdné.
4. Do všech zkumavek **přidejte** po 200 µl radioindikátoru (červený roztok).
5. **Napipetujte** 200 µl roztoku TATI monoklonální protilátky (modrý roztok) do všech zkumavek, vyjma zkumavek pro NSB a pro celkovou radioaktivitu. Do NSB zkumavek přidejte 200 µl destilované vody.
6. Všechny zkumavky pečlivě **ručně zatřepete** stojánkem.
7. Zkumavky **přikryjte** fólií a inkubujte přes noc při laboratorní teplotě.
8. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro měření celkové radioaktivity, **dekantujte** a zbytek tekutiny nechte **vstřebat** do buničité vaty jemným poklepáním.
9. Všechny zkumavky, vyjma zkumavek pro měření celkové radioaktivity, **promyjte** 1 ml destilované vody a **ručně zatřepete** stojánkem. Zkumavky **dekantujte** a zbytek tekutiny z každé zkumavky nechte jemným poklepáním **vstřebat** do buničité vaty. Zkumavky **nechte stát** vzhůru dnem alespoň 5 minut. Znovu **poklepte**, dokud zkumavky nejsou prázdné.
10. Aktivitu všech zkumavek **změřte** pomocí gamma-čítače po dobu alespoň 1 minuty nebo po akumulaci 10 000 impulsů/ zkumavku.

Poznámky

Abyste dosáhli vysoké přesnosti, dodržujte následující pravidla:

- Reagensy pipetujte přímo na dno zkumavek.
- Předcházejte poškrábání dna zkumavek špičkami pipet.
- Po dekantaci je důležité zkumavky účinně vyprázdnit.

OMEZENÍ METODY

Jako základ pro jakékoli diagnostické a terapeutické rozhodnutí musí být výsledky jednotlivých testů podloženy jinými klinicky relevantními daty. Vzorky obsahující heterofilní protilátky mohou způsobovat chybné výsledky.

ZAJIŠTĚNÍ JAKOSTI

Doporučujeme všem laboratořím používat interní program kontroly kvality tak, že se současně analyzují séra s nízkou i vysokou hraniční koncentrací normálního rozmezí.

Doporučujeme, aby si každá laboratoř vytvořila vlastní přijatelné rozmezí používané pro kontrolní vzorky. Průměr kontrolního rozmezí by měl být uvnitř přijatelného rozmezí daného výrobcem. K měření kontrolních hodnot použijte alespoň dvou různých šarží.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

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

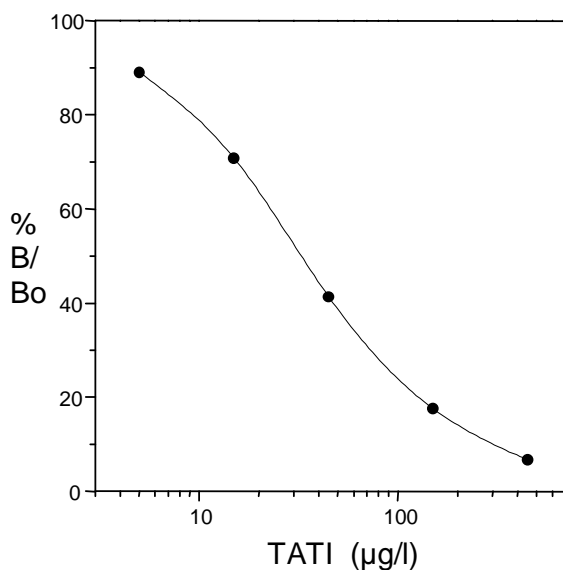
Vypočtete průměr četností všech zkumavek.

Vypočtete % (B/Bo) pomocí rovnice:

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

Vyneste kalibrační křivku v semi – logaritmických souřadnicích tak, aby % (B/Bo) byly na ose **y** a koncentrace kalibrátorů TATI na ose **x**.

Odečtete koncentrace TATI v neznámých vzorcích z kalibrační křivky a zprůměrujte hodnoty duplikátů.



Zkumavka	Průměr cpm	cpm-NSB	%B/Bo	TATI (µg/l)
Celková aktivita	42538			
NSB	385			
Kalibrátor 0	18032	17647		
Kalibrátor 5	16082	15697	89,0	
Kalibrátor 15	12877	12492	70,8	
Kalibrátor 45	7673	7288	41,3	
Kalibrátor 150	3490	3105	17,6	
Kalibrátor 450	1573	1188	6,7	
Neznámý vzorek 1	13743	12858	72,9	13,7
Neznámý vzorek 2	2898	2513	14,2	197,1

Obr. 1 Typická kalibrační křivka. výpočet. Příklad.
(str. 9 originální příbalové informace)

Tabulka 1 Typická kalibrační křivka a výsledků. Příklad.

REFERENČNÍ HODNOTY

Z důvodů etnických, dietárních a věkových variací, tyto referenční hodnoty nemusí odpovídat celé populaci. Proto by si měla každá laboratoř udělat vlastní rozmezí referenčních hodnot.

U zjevně zdravých jedinců byly měřeny hodnoty TATI ve vzorcích séra a moče. Neparametrickou metodou, doporučenou IFCC, byly vyhodnoceny referenční intervaly a interval spolehlivosti pro vyšší a nižší hranici rozmezí.

Tabulka 2 Referenční hodnoty sérového TATI

	Sérum	Moč
Počet jedinců	282	57
Průměr	8 µg/l	
Referenční interval*)	5-14 µg/l	9-34 µg/g kreatininu
0,90 – interval spolehlivosti		
pro nižší referenční hranici	3-5 µg/l	
pro vyšší referenční hranici	13-18 µg/l	

*referenční interval = 0,025 & 0,975 fraktil

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

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

Měřicí rozmezí

5-450 µg/l.

Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detegovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulových kalibrátorů je přibližně 4 µg/l.

Ředění

Sérové vzorky s vysokou koncentrací TATI mohou být zředěny v poměru 1:5 nulovým kalibrátorem ze soupravy.

Preciznost (precision)

Vzorky s různou koncentrací TATI byly analyzovány k určení intra-assay a inter-assay variability.

Tabulka 3 Intra-assay / inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 6 replikátů			Inter-assay preciznost 9 duplikátů		
Vzorek	Průměr (µg/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (µg/l)	CV (%)
1	8,5	13,7	7	7,8	10,4
2	15,3	5,5	8	10,1	11,0
3	22,7	5,9	9	17,3	3,4
4	82,7	6,5	10	174	5,6
5	187	7,7	11	209	6,6
6	224	10,6	12	364	7,9

Spectria TATI RIA

Kat.č. 67105

Obsah soupravy (100 testů)

TATI coated tubes: ZKUMAVKY S NAVÁZANOU PROTILÁTKOU PROTI TATI
TATI tracer: TATI RADIOINDIKÁTOR
TATI monoclonal antiserum: ROZTOK MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI TATI
TATI calibrators: TATI KALIBRÁTORY
TATI controls: TATI KONTROLY
TATI wash solution: TATI PROMÝVACÍ ROZTOK

Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v μ l)

	Celková aktivita	NSB	Kalibrátor	Kontrolní/ Neznámý vzorek
Pipetování vzorku		50*	50	50
Pipetování radioindikátoru (červený)	200	200	200	200
Pipetování roztoku TATI protilátky (modrý)			200	200
Pipetování destilované vody		200		
Promíchání		x	x	x
Inkubace přes noc při laboratorní teplotě		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Promývání 1ml destilované vody		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Měření po dobu 1min. nebo 10.000 impulsů	x	x	x	x

*) pro NSB je možno použít jakékoli patientské sérum

SPECTRIA je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy.

67105-CZ05

Sídlo v ČR: Orion Diagnostica-organizační složka
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6
Tel. 233 350 533, fax: 233 350 532
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz