

# PIIINP<sub>RIA</sub>

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

## **Návod k použití soupravy**

**Březen 2008**

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)	



**Orion Diagnostica**



**Výrobce:**

Orion Diagnostica Oy  
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland  
Tel. +358-10-4261, Fax +358-10-426 2794  
www.oriondiagnostica.fi



## Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

IVD

Diagnostický zdravotnický  
prostředek in vitro

REF

Katalogové číslo

LOT

Číslo šarže



Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití

Ag <sup>125</sup>I

Radioindikátor

Ab PIIINP

Antisérum

CONTROL

Kontrol

CAL 0

Koncentrace kalibrátoru

ORIG HUM

Původ: lidský

CONT NaN<sub>3</sub>

Obsahuje azid sodný



Škodlivé

Xn

## **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.

U dětí s růstovým deficitem zvýšené hodnoty sérového PIIINP reflektují počátek růstu.

Při jaterní fibróze a cirhóze různého původu vzrůstá koncentrace PIIINP. Zdá se, že velikost těchto změn je vyšší v případě zánětu než v případech asymptomatické akumulace pojivové tkáně. Při fibrotických stavech plic, jako je idiopatická plicní fibróza nebo plicní sarkoidóza, mohou být sérové hladiny PIIINP normální, zatímco v tekutině získané bronchoalveolární laváží mohou být zjištěny vysoké koncentrace.

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.

Sérové koncentrace PIIINP reflektují opravný proces a vytvářejí jizvy po prodělaném infarktu myokardu a také koreluje s velikostí infarktu, disfunkcí levé komory a při věnčité srdeční okluzi.

### **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
<b>PIIINP RIA TRACER:</b> RADIOINDIKÁTOR PIIINP RIA: Připraven k použití. Radioindikátorem je [ <sup>125</sup> I]- značený PIIINP v PBS tlumivém roztoku. NaN <sub>3</sub> a červené barvivo.	1 lahvička 22 ml Radioaktivita <200kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>PIIINP RIA ANTISERUM:</b> ANTISÉRUM PIIINP RIA: Připraveno k použití. Králičí antisérum v PBS tlumivém roztoku. NaN <sub>3</sub> a modré barvivo.	1 lahvička 22 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>PIIINP RIA CALIBRATORS:</b> KALIBRÁTORY PIIINP RIA: Připraveny k použití. Koncentrace PIIINP 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 a 50 µg/l v lidské sérum. NaN <sub>3</sub> . <i>Kalibrováno proti interní master kalibrační soupravě</i>	7 lahviček 1,5 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>PIIINP RIA CONTROL:</b> PIIINP RIA KONTROL: Lyofilizované lidské sérum. NaN <sub>3</sub> . 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.
<b>PROCOLLAGEN SEPARATION REAGENT:</b> PROKOLAGENOVÁ SEPARAČNÍ REAGENCIE: Připravena k použití. Separační reagent je suspenze sekundární protilátky kovalentně vázané k pevné fázi. NaN <sub>3</sub> .	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 (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  $^{125}\text{I}$  (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 (NaN<sub>3</sub>)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azid sodný, 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 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<sub>3</sub> toxické výpary.

## **PŘÍSTROJE**

K měření lze použít jakýkoliv gama čítač schopný měření <sup>125</sup>I. 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 dodávaném výrobcem přístroje.

## **MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU**

Ačkoliv jsou pro zpracování doporučovány vzorky sér, soupravu lze rovněž použít pro vzorky heparinizované plazmy nebo EDTA plazmy. Nepoužívejte vzorky citrátové plazmy.

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.

## PRACOVNÍ POSTUP

### Potřebný materiál, který není součástí soupravy:

MIKROPIPETY pro přesné dávkování 200 µl, 500 µl 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 µl 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 µl radioindikátoru (červený).
5. Do všech zkumavek, kromě NSB a celkové aktivity, **napipetujte** 200 µl roztoku protilátky (modrý). Do zkumavek určených pro stanovení NSB přidejte 200 µl 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 µl 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** a zbytek tekutiny nechte **vstřebat** jemným poklepáním do buničité vaty. Dejte pozor, aby nedošlo k dekantaci precipitátu. **Zkumavky jednou otočené nazpět již znovu dnem vzhůru neotáčejte.**
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.

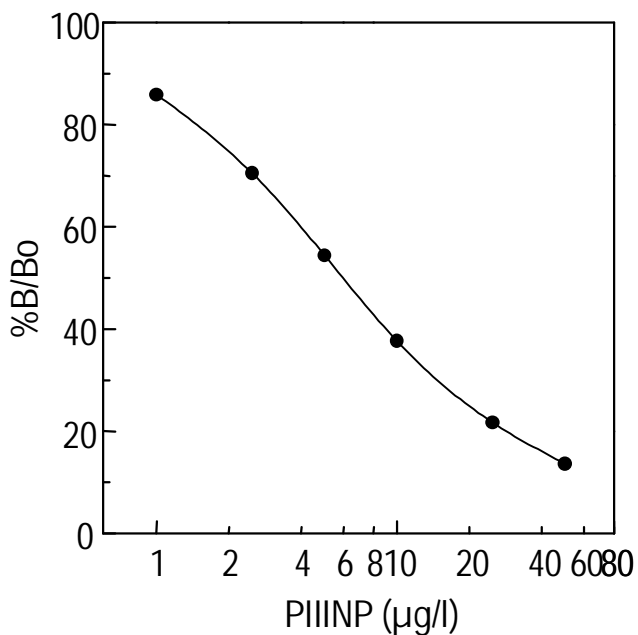
**Vypočtete** střední hodnotu impulsů pro všechny kalibrátory, vzorky a kontroly.

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

**Obr. 1**

Typická kalibrační křivka. Příklad.

(str. 8 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**

	<b>Dospělí</b>
Počet sledovaných osob	232
Průměr	3.7 µg/l
Referenční interval*	<b>2.3 - 6.4 µg/l</b>
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**

<b>Věková skupina</b>		<b>Članky (µg/l)</b>		<b>Chlapci (µg/l)</b>
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.

### Ředění

Vzorky s vysokou koncentrací PIIINP mohou být ředěny fyziologickým roztokem nebo nulovým kalibrátorem ze soupravy.

### Metoda standardního přídávku

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

### Preciznost (precision)

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 preciznost

Intra-assay preciznost 16 replikátů			Inter-assay preciznost 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**

Test Intact UniQ PIIINP RIA nedetekuje degradační produkty propeptidu o malé molekulové hmotnosti, které se nacházejí v krvi. Měří propeptid a jeho formy o vyšší molekulové váze. UniQ PIIINP RIA zkříženě nereaguje s antigeny použitými v soupravách UniQ PINP.

# UniQ PIIINP RIA

Intaktní N-terminální propeptid prokolagenu typu III  
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou  
protilátkou  
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)

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

JP Patent č. 2801212

EP Patent č.304292

UniQ je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy.

68570-CZ06

Zastoupení výrobce v ČR:

Orion Corporation 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](mailto:orion@oriondiagnostica.cz)  
[www.oriondiagnostica.cz](http://www.oriondiagnostica.cz)