

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-046
Упутство за методу испитивања карбохидратног антигена 15-3 (CA 15-3)				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2024-12-24	mr ph Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

СА 15-3 је тумор маркер који је често повећан код пацијенткиња са карциномом дојке. СА 15-3 може имати велики клинички значај за праћење одговора пацијената који су на терапији, због тога што повишене или снижене вриједности корелирају са прогресијом, односно регресијом болести. Повећане вриједности СА 15-3 код пацијената који носе ризик од рецидива карцинома дојке након примарне терапије, могу бити индикатори рецидива болести, чак и прије него што се болест може клинички детектовати. Повећане вриједности СА 15-3 могу се јавити код особа које имају болести које нису малигне као што су цирроза, хепатитис, аутоимуна обољења и бенигне болести јајника и дојке. Вриједности СА 15-3 могу да буду повећане и у неким другим малигним болестима, нпр. плућа, колона, панкреаса, јетре (примарно), јајника, грлића материце и ендометријума. Вриједности СА 15-3 углавном нису повећане код већине здравих особа. СА 15-3 тест се не препоручује као скрининг тест за детекцију карцинома, већ само као помоћ у лечењу пацијенткиња са карциномом дојке.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Овај тест је двостепено имуноодређивање за квантитативно одређивање DF3 дефинисаних антигена у хуманом серуму и плазми које користи хемилуминисцентно имуноодређивање са микрочестицама (CMIA). Узорак, парамагнетне микрочестице обложене 115D8 и пуфер за испирање се мешају и инкубирају. DF3 дефинисани антиген у узорку везује се за микрочестице обложене 115D8. Смјеша се испира. Додаје се акридинијумом обележени коњугат DF3и инкубира, како би се формирала реакциона смјеша. Након још једног циклуса испирања, додају се преактивирајући (пре-триггер) и активирајући (триггер) раствори. Настала хемилуминисцентна реакција мјери се у релативним свјетлосним јединицама (RLU). Директна пропорционалност постоји између количине DF3 дефинисаних антигена у узорку и RLU детектованих оптиком анализатора.

Методологија: Хемилуминисцентно имуноодређивање микрочестицама (CMIA)

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1 Прецизност

Репрезентативни резултати испитивања унутар-лабораторијске прецизности теста помоћу CLSI-овам протокола EP05-A2 приказани су у табели 1.

Лого организације	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-046
		1	2024-12-24	

Табела 1. Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (ng/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Узорак 1	120	28.4	0.69.	2.4	0.99	3.5
Узорак 2	118	109.2	2.39	2.2.	4.03	3.7
Узорак 3	120	201.3	6.02	3.0	8.46	4.2
Узорак4	120	439.0	12.96	3.0	22.06	5.0
Узорак5	119	618.7	19.26	3.1	32.54	5.3

SD-стандарднадевијација; %KV-коэффициентваријације

3.2 Линеарност

СА 15-3 тест за узорке серума линеаран је у интервалу од 0.6до 800.00 U/mL.

3.3 Граница детекције (LOD- eng. Limit of Detection)

LODјенајмањаколичинааналитауузоркукојасе можедетектовати. LODзаСА 15-3усерумује 0,4 U/mL.

3.4 Граница квантификације (LOQ)

Границаквантификације (LOQ) јеконцентрација анализата која се можеодредити уз одговарајућу тачност и прецизност. LOQза СА 15-3усерумује 0,6U/mL.

3.5 Поређење метода

Резултатидобијени одређивањемСА 15-3у серуму на Alinity ciанализатору упоређени су са резултатима добијеним на ARCHITECT ci анализатору Passing-Bablok регресионом анализом.

Табела 2. Поређење метода Alinity ci CA15-3vs ARCHITECT ciCA 15-3

врста узорка	јединица	n	коэффициент корелације	одсјечак на у оси	нагиб	интервал концентрације
серум	U/mL	129	1,00	-0,55	0,95	2,7-982,3

Лого организације	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-046
		1	2024-12-24	

4. ВРСТА УЗОРКА

Врста узорка: За тестирање се могу користити узорци серума и плазме.

Чување узорака: Анализа узорака се врши у што краћем временском периоду. Избјегава се вишекратно замрзавање и одмрзавање узорака. Ако се узорци не тестирају у року од 24 сата серум или плазма се одвајају од угрушка или гела у епрувети. Стабилност узорака приказана је у табели 3.

Табела 3. Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања
	серум/плазма
2 до 8 °C	≤7 дана
-20 °C и нижа t	>7 дана

Транспорт узорка: Узорке до мјеста обраде је потребно доставити у одговарајућем положају и на сталцима, при чему крв не смије да буде у додиру са чепом. Препоручено вријеме доставе до лабораторије је 2 сата од узимања узорка.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Препорука је да се узорак крви узима наште, ујутру најмање 12 сати након последњег оброка, као и да вријеме за вађења крви буде између 7 и 10 h. Дан прије вађења крви треба узимати уобичајне оброке, али не премасне. За вечеру конзумирати лакшу храну. Вечера треба да буде најкасније до 19 h. Послије 19 h може се пити течност, изузев алкохола, кафе и претјерано заслађених напитака. Дан прије узимање крви треба избјежавати интензивну физичка активност. На дан узимања крви, ујутру, не треба ништа јести, пити ни пушити.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

За узорковање крви се користе пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације са или без гела. Када се пареметар одређује из плазме узорковање крви се врши у епруветама салитијум/натријум хепарином (сиви чеп) и K-EDTA (љубичасти чеп) каоантикоагулансима.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: реагенс сет, *Alinity ci*, *Abbott* анализатор заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице. Сет реагенаса за одређивање CA15-3 је у течном облику, спреман за употребу и садржи један реагенс, чије су компоненте приказане у табели 3.

Сет реагенаса за одређивање CA 15-3 је у течном облику, спреман за употребу и садржи два реагенса, чије су запремине и компоненте приказане у табели 4.

Табела 4. Компоненте реагенса CA 15-3

Реактивне компоненте	Минимална концентрација
<i>Microparticles:</i>	
Микрочестице обложене антителима CA 15-3 (мишија, моноклонска) у TRIS пуферу са протеинским стабилизаторима	0,09 %

Лого организације	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-046
		1	2024-12-24	

- Протеински (говеђи) стабилизатор
- Конзерванс: натријум азид и ProClin 300

Conjugate:

- Акридиномобилеженкоњугатантијела на
СА 15-3 (мишија, моноклонска)
уфосфатномпufferу са протеинским
стабилизаторима 0,05 µg/mL

- Конзерванс: Натријум азид и ProClin 300

Додатни материјали потребни за извођење теста су: *CA 15-3 Calibrators; Multichem IA plus Controls, Pre-Trigger Solution, Trigger Solution и Wash Buffer.*

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтјевају испитивања која се спроводе и прописане су у упутству *УП-10-138 Обезбјеђење и праћење услова средине у процесу испитивања*. У просторији у којој је смјештен апарат, температура је прилагођена условима који су прописани од стране произвођача опреме и захтјевима испитивања. Температура се одржава на вриједностима до 25 °C, што се евидентира у обрасцу *ОБ-10-221 Евиденција температуре*.

Упутством *УП-10-13 Мјере заштите на раду у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*, прописују се мјере заштите на раду.

Овај тест захтијева руковање хуманим узорцима. Сваки узорак крви или другог биолошког материјала који се достави у лабораторију је потенцијално инфективан, па је неопходно да се са овим материјалом крајње пажљиво рукује. То значи да приликом манипулације узорцима и при раду са апаратом треба користити рукавице за једнократну употребу, као и друга заштитна средства.

Подаци о идентификацији хемикалија, опасности, мјерама прве помоћи и осталим подацима везаним за безбједност примјененог реагенса СА 15-3 се налази у Безбједносним листовима везаним за Alinity i СА 15-3 Reagent Kit као и у упутству *УП-10-166 Упутство за безбједно руковање хемикалијама у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Калибрација се врши 4PLC методом (енгл. 4-parameter logistic curve fit data reduction method), гдје се као калбратори користе СА 15-3 Calibrator.

Калибрација је потребна након сваке промјене серије реагенса (лот) и ако су контроле изван прихватљивих распона концентрација. Калибратори се тестирају у дупликату. Ваљаност калибрације се провјерава спровођењем интерне контроле квалитета.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Прије постављања реагенса сета на анализатор бочице са микрочестицама се добро промјешају, како би се извршило потпуно суспендовање честица.
2. Прије анализе узорака, спроводи се интерна контрола квалитета и по потреби калибрација.
3. Запремина узорака за први тест је 150 µL (у режиму за хитно тестирање 70 µL), запремина узорка за сваки додатни тест који се изводи на узорку из исте чашице је 20 µL

Лого организације	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-046
		1	2024-12-24	

4. Узорци се стављају у епрувете или чашице са бар кодовима пацијената на носаче, сталке (*carrier*).
5. Након постављања узорака на транспортни модул врши се њихова идентификација скенирањем бар кода, након чега се врше аналитички процеси испитивања узорка.
6. Поступак аналитичког процеса је следећи:
 - a. У реакциону посуду са узорком се пипетирају парамагнетисане честице са антителима на СА 15-3(сепарациона антители), након чега се врши мјешање реакционе смјеше
 - b. Реакциона смјеша се инкубира, а анализи из узорка се везују за антители на парамагнетисаним честицама, стварајући имунски комплекс
 - c. Магнет привлачи парамагнетисане микрочестице (везане заиспитивани аналит) на зид реакционе посуде
 - d. Зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле невезана једињења
 - e. У реакциону смјешу се пипетира хемилуминисцентни коњугат обиљежен акридинијумом, коњугат се веже за имунски комплекс да би довршио реакцију
 - f. Реакциона смјеша се инкубира и зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле невезана једињења
 - g. Pre-triggerсолуција (натријум хидрокси) обезбјеђује базну средину, спречава рану емисију свјетлости, спречава агрегацију микрочестица и раздваја обиљеживача акридинијум од коњугата
 - h. Trigger солуција, активацијски раствор (натријум пероксид), који представља оксидациона средство, у базној средином, доводи до реакције оксидације акридинујма, ексцитирани производи формирани у реакцији оксидације након тога емитују свјетлост-хемилуминисценција

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета спроводи се примјеном контролних материјала које препоручује произвођач, а то су *Technopath Multihem IA Plus* ниво 1, *Technopath Multihem IA Plus* ниво 2 и *Technopath Multihem IA Plus* ниво 3. Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, сваког дана, прије почетка спровођења рутинских анализа. Такође, контрола квалитета се спроводи при промјени серије реагенса или калибратора (лот). Резултати статистичке обраде при интерној провјери аутоматски се приказују на контролној карти која се креира за сваки параметар посебно, чиме се оцијењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је вриједност контролног узорка унутар двије стандардне девијације метода је под контролом и резултати пацијената се могу издати.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА,БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Потенцијалнеинтерференцијесахемоглобином, билирубином,триглицеридимаипротеинимауСА 15-3тесту, при наведеним концентрацијама је <12 %.

Хемоглобин: 500mg/dL

Билирубин: 20 mg/dL

Триглицериди: 3 g/dL

Протеини: 12 g/dL

Лого организације	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	MI-10-046
		1	2024-12-24	

Циклофосфамид: 500 µg /mL

Доксорубицин: 1.16 µg/mL

Леуковорин: 2.68 mg/mL

Метотрексат: 45 µg/mL

Паклитаксел: 3.5 ng/mL

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Принцип одређивања и израчунавања концентрације СА 15-3 се заснива на методи 4PLC, гдје анализатор мјери хемилуминисцентну емисију калибратора, мјерењем реалтивних свјетлосних јединица (RLU) и генерише калибрациону криву, док при анализи мјери хемилуминисцентну емисијуаналита,коју анализатор аутоматски конвертује у концентрацију.

Мјерна несигурност за СА 15-3 је $\pm 1,82\%$.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за СА15-3 препоручен од стране произвођача је $<31,0\text{U/mL}$.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Интервал извјештавања о резултатима испитивања за СА 15-3 представља 0,6 до 800,0U/mL.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорци у којима су концентрације СА 15-3изнад 800,00 U/mL, могу се разблажити аутоматски или ручно. Анализатор разблажује узорак у односу 1:5 и аутоматски израчунава концентрацију множењем резултата фактором разблаживања. По потреби се може направити додатно ручно разблажење од 1:5. Ако оператер не унесе фактор разблажења, добијена концентрација се мора ручно помножити са одговарајућим фактором разблажења прије издавања резултата.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Запостављањедијагнозеипраћењетокаболести,потребнојеузети у обзир карактеристике пацијента, тренутну клиничку слику, ранија и тренутна обољења или патолошка стања, терапију коју пацијент прима и др., како би се лабораторијски налаз исправно интерпретирао.Пацијенткиње с потврђеним канцером дојке могу имати вредности теста СА 15-3 у истом опсегу као и здраве особе. Повишене вриједности циркулишућег антигена су могуће и код пацијената са немалигним болестима. Због тога вредности СА 15-3 теста не могу да се тумаче као маркери присуства или одсуства малигнитета. Вриједности СА 15-3 теста треба користити заједно са другим дијагностичким процедурама. Alinity ci СА 15-3 тест не смије да се користи за скрининг карцинома.

Повишеневриједности: $>31,0\text{ U/mL}$

Сниженевриједности:/

Лого организације	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МП-10-046
		1	2024-12-24	

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Егзогени фактори варијабилности за одређивање СА 15-3 су аутоантитијела у хуманом серуму. Хетерофилна антитијела у хуманом серуму могу да реагују с имуноглобулинима у реагенсу и интерферирају у *in vitro* имуноодређивањима. Пацијенти који су свакодневно у контакту са животињама или производима серума животиња могу да буду склони овој интерференцији. Додатне информације могу бити потребне за постављање дијагнозе. Узорци пацијената који су примали мишја моноклонска антитела у дијагностичке или терапијске сврхе могу да садрже хумана анти-мишја антитијела (НАМА). Такви узорци могу да покажу лажно повишене или снижене вриједности када се тестирају сетовима тестова као што је СА 15-3 који користе мишја моноклонска антитела. Додатне клиничке или дијагностичке информације могу да буду потребне за одређивање статуса пацијента.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. СА15-3 тест, Упутство произвођача за одређивање СА 15-3 на *Alinity ci* анализаторима - преведено на српски језик, 2023.
2. Мајкић-Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд
3. Хоновић Л. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријеманалитичку фазу лабораторијске дијагностике? Гласник пулске болнице, 10 (10), 21-25.
4. Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.
5. Ћорић, Ј. (2014). Контрола квалитете рада у лабораторијској медицини. Факултет здравствених студија. Сарајево
6. Безбједосни лист-Alinity i СА 15-3 Reagent Kit. Abbott Laboratories, 2023
7. Ристић С., Пухало-Сладоке Д., Тошовић Д. (2013). Туморски маркери. Биомедицинска истраживања. 4 (2); 48-60