

PATHOZYME® BREAST CANCER ANTIGEN 15-3 ^{Ref} OD297

Immunoenzymatyczny test (EIA) do ilościowego oznaczania CA15-3 w ludzkiej surowicy.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.
Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Rak piersi jest najczęstszym występującym rodzajem nowotworu (z wyjątkiem niezłośliwych nowotworów skóry) wśród kobiet i należy do jednej z głównych przyczyn umieralności kobiet w przedziale wiekowym między 40 a 55 rokiem życia. Jednym z kluczowych markerów wykorzystywanym do wykrywania tej choroby jest Antygen Nowotworowy CA 15-3, jak również inne markery w tym CA 59.9.

CA 15-3 jest glikoproteiną o budowie podobnej do mucyny i o dużej masie cząsteczkowej. Czynnik ten zlokalizowany jest na szczytowej stronie pęcherzyków i przewodów gruczołów sutkowych oraz jest obecny jako antygen krążący. CA 15-3 występuje u ponad 80% wszystkich przypadków przerzutów raka piersi. Poziom CA 15-3 może być również podwyższony w nowotworach niezłośliwych, szczególnie w tych pochodzenia wątrobowego, chociaż w tych przypadkach poziom CA 15-3 rzadko przekracza 100 U/ml. Podwyższony poziom CA 15-3 stwierdzono u 5% zdrowych osobników grupy kontrolnej.

Nie ma korelacji pomiędzy poziomem CA 15-3 w surowicy, a obrazem choroby i prognozą. Jednakże bardzo wysoki poziom CA 15-3 (5-10-krotnie wyższy od wartości prawidłowych) wskazuje na szybko toczący się proces choroby i możliwość wystąpienia przerzutów. Badania wskazują, że występuje korelacja pomiędzy zmianą poziomu CA 15-3, a odpowiedzią na zastosowane leczenie w przerzutach nowotworowych, ale nie można się na tym opierać bez potwierdzenia badaniami klinicznymi.

Wzrost poziomu Antygeny Nowotworowego 15-3 również występuje w nowotworach okrężnicy

PRZEZNACZENIE

PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3 jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania Antygeny Nowotworowego 15-3 w ludzkiej surowicy.

Do użytku w laboratorium.

ZASADA

Test CA 15-3 ELISA jest oparty na zasadzie wykonania oznaczenia z wykorzystaniem zasady wiązania antygen-przeciwciała na fazie stałej. Do oznaczenia użyto monoklonalne przeciwciała bezpośrednio skierowane przeciwko różnym antygenowo determinantom (na - mikrotytuł). Roztwór koniugatu enzymatycznego zawiera królicze przeciwciała anti-CA 15-3 znakowane peroksydazą chrzanową (HRP). Antygen CA 15-3 obecny w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniugat enzymatyczny również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po dwóch oddzielnych inkubacjach, nadmiar niezwiązanych, znakowanych przeciwciał zostaje odpłukany przy użyciu wody destylowanej. Dodanie substratu TMB inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na obecność Antygeny Nowotworowego 15-3 w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji następuje po dodaniu odczynnika zatrzymującego reakcję, a barwa zmienia się na kolor żółty. Steżenie CA 15-3 w badanej próbce jest wprost proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia. Absorbancja jest mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 450nm. Test został wykalibrowany względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU

^{Ref}
OD297



Microtitre Plate	12 x 8 wells x 1
Dzielnia mikrotytułowa z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torbie ze środkiem pochłaniającym wilgoć.	
Cal A	0 U/ml 2 ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona CA 15-3. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal B	15 U/ml 2 ml
Standard referencyjny: CA 15-3 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal C	30 U/ml 2 ml
Standard referencyjny: CA 15-3 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal D	60 U/ml 2 ml
Standard referencyjny: CA 15-3 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal E	120 U/ml 2 ml
Standard referencyjny: CA 15-3 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal F	240 U/ml 2 ml
Standard referencyjny: CA 15-3 rozpuszczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Conj	22X 1 ml
Anty-CA 15-3 HRP Koncentrat Koniugatu: koncentrat koniugatu anty-CA 15-3 znakowany peroksydazą chrzanową. (Bezbarwny)	
DIL	SPEC 2 X 50ml
Rozcieńczalnik próbek: bufor fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Roztwór roboczy. (Żółty)	
DIL	Conj 21 ml
Rozcieńczalnik koniugatu: bufor fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Roztwór roboczy. (Różowy)	
Subs	TMB 11 ml
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzodyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Soln	Stop HCl 1M 11 ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	

Instrukcja i druk protokołu.

1 + 1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.
Końcówki do pipet.
Vortex.
Ciepłarnia: z temperaturą 37°C ± 1°C
Papier absorbujący.
Czynnik mikroptyłek z filtrem 450 nm.
Papier milimetrykowy.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME CA 15-3** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw **PATHOZYME CA 15-3** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw **PATHOZYME CA 15-3** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu splukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME CA 15-3** zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu splukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żylnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydki sodowej jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

Aby przygotować roztwór roboczy koniugatu anty-CA 15-3 należy dodać jedną część koncentratu koniugatu do 21 części rozcieńczalnika koniugatu (rozcieńczenie 1/22); wymagane jest użycie 200µl na każdy kubeczek. Roztwór roboczy przechowywany w temperaturze 2°C - 8°C jest trwały cztery miesiące.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

- Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikrotytułowej. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
- Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torbie ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
- Zygotować rozcieńczenia próbek badanych. Zmieszać 20 µl surowicy badanej z 1000 µl rozcieńczalnika próbek. Nie rozcieńczać standardów, są już rozcieńczone i gotowe do użycia.

OCENA WYNIKÓW

- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 200µl standardów i rozcieńczonych próbek badanych. Delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze 37°C.
- Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
- Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytłuszczyć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
- Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
- Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
- Do wszystkich kubeczków dodać po 200 µl roboczego roztworu koniugatu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze 37°C.
- Przemyc kubeczki jak podano powyżej.
- Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
- Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
- Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplatek przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplatek (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikroplatek z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C), rozcieńczone standardów, są już rozcieńczone i gotowe do użycia.

Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odzwierciedlenia wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{450}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach U/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości CA 15-3 dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji OD450 w stosunku do odpowiednich stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

Stężenie Antygenu Nowotworowego 15-3 u zdrowych kobiet nie powinno przekraczać 35 U/ml. Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** stężenie CA 15-3 wynosi 5 U/ml.

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów. Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyne CA 15-3 kit i Abbott AxSym Kit użyto próbek o wartościach CA 15-3 pomiędzy 8.0 U/ml a 2000 U/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	63
Współczynnik korelacji	0.97
Wartość nachylenia krzywej	0.93
Punkt przecięcia z osią OY	10.2
Wartość średnia testem Omega	209.9 U/ml
Wartość średnia testem Abbott	197 U/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

- Aziz D. C.** Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analysis. *AJ. Clin. Pathol.* 1992;98:105-11.
- Aziz DC, Peter J. B.** DNA ploidy and cell cycle analysis. Tools for assessment of cancer prognosis. *J. Clin. Pathol.* 1991;5:422-38.
- Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Dounds G, Oldaker T, McGuire W.L.** Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.* 1989;320:627-33.
- Elledge RM, McGuire W. L.** Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu. Rev. Med.* 1993;44:201-10.
- Foekens JA, Rio C, Seguin P. et al.** Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein. *Cancer. Res.* 1990 50:3832-7.
- Isola H, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi D.** Association of p53 expression with other prognostic factors and long term survival in node-negative breast cancer. *J. Cell. Biochem.* 1992;(Suppl 16D):101.
- Kute TE, Shao ZM, Snugg NK, Long RT, Russell GB, Case L. D.** Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays. *Cancer. Res.* 1992;52:198-203.
- McGuire WL, Tandon AK, Alfred D, Chammes G.C., Clark, G. M.** How to use prognostic factors in axillary node-negative patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990;82:1006-7.
- Nicholson S, Richard J, Sainsbury C. et al.** Epidermal growth factor receptor (EGFR): results of a 6 year follow up study in operable breast cancer with emphasis on the node-negative subgroup. *Br. J. Cancer* 1991;63:146-50.
- Somerville JE, Clarke LA, Biggart J. D.** C-erb B-2 overexpression and histological type of in-situ and invasive breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1992;45:16-20.
- Ueronese S, Gambocorta M.** Detection of Ki-67 rate in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991;95:30-4.
- Lotnick M, Pavesi F, Scarabelli M.** Tumour associated antigens CA-15-3 and CA-125 in ovarian cancer. *Int. J. Biol. Markers* 1991;6:115.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 200µl of standardów lub rozcieńczonych próbek badanych i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze 37°C.
- Wylać zawartość z kubeczków i przemyc 5-krotnie wodą destylowaną.
- Do każdego kubeczka dodać po 200µl roboczego roztworu koniugatu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze 37°C.
- Wylać zawartość z kubeczków i przemyc 5-krotnie wodą destylowaną.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 10 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8079 ISSUE 5A Revised July 2010
© Omega Diagnostics Ltd 2010. POLISH



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY