

# PATHOZYME® BREAST CANCER ANTIGEN 15-3

**Ref** OD297

## Test Imuno-enzimatic (EIA) pentru Determinarea Cantitativă a CA 15-3 în serul uman Depozitați la 2°C - 8°C . NU CONGELAȚI. Doar pentru diagnostic in-vitro.

### INTRODUCERE

Cancerul de sin este cea mai frecventă formă de cancer (cu excepția cancerului de piele non-melanomic) printre femei și este cauza principală de deces prin cancer la femeile între 40 și 55 de ani. Unul din markerii principali pentru această boală este **Antigenul Cancer 15-3**; alți markeri includ CA549. CA15-3 este prezent la mai mult de 80% din toate cazurile de cancer de sin cu metastaze. Este localizat pe partea apicală a alveolelor și ductelor glandelor mamare și este prezent ca și antigen circulant. Niveluri crescute de CA15-3 pot fi prezente și în afecțiuni benigne, în special în cele de origine hepatică; în aceste situații, rareori nivelul de CA15-3 poate fi mai mare de 100U/ml. Niveluri crescute de de CA15-3 se găsesc și la aproximativ 5% din persoanele sănătoase folosite în studii ca și control. Nu există o corelație între nivelurile serice de CA15-3, stadiul bolii și prognosticul bolii. Cu toate acestea niveluri foarte mari de CA15-3 (de 5-10 ori valoarea normală) tind să indice un stadiu avansat al bolii și posibil prezența bolii metastatice. Studii au sugerat că există o bună corelație generală între modificarea nivelurilor de CA15-3 și răspunsul la tratamentul în cancerul metastatic, însă aceste date nu pot fi scoțite definitive în absența unor studii clinice de confirmare. Niveluri crescute de Antigen Cancer 15-3 se găsesc deasemenea și în tumorile de colon, plămân și ficat.

### UTILIZARE

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** este un test Imuno-Enzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a Antigen Cancer 15-3 în serul uman. A fi utilizat doar de personalul medical.

### PRINCIPIUL TESTULUI

Testul ELISA CA15-3 se bazează pe principiul unui test de imunoabsorbție linkat enzimatic, de fază solidă. Testul folosește un anticorp monoclonal contra unui determinant antigenic distinct (pe placa de microtitrare). În soluția de conjugat anticorp-enzimă se găsește un anticorp anti-CA15-3 de iepure conjugat de peroxidază hrean (HRP). Proba de testat este apoi lăsată să reacționeze secvențial cu cei doi anticorpi, ceea ce determină moleculele de CA15-3 să formeze o structură de tip sandwich între anticorpii de fază solidă și cei marcați enzimatic. După doi pași separați de incubare, godeurile sunt spălate cu apă distilată pentru a îndepărta anticorpii marcați nelegați. Se adaugă o soluție de reactiv TMB și o culoare va apare doar în acele godeuri în care este prezentă enzima, ceea ce indică prezența Antigenului Cancer 15-3. Procesul de formare al culorii este oprit prin adăugarea Soluției de Stopare, culoarea modificându-se astfel în galben. Concentrația de CA15-3 este direct proporțională cu intensitatea culorii probei de testat. Absorbția este apoi măsurată spectrofotometric la 450nm. Acest test a fost calibrat cu standarde interne. Nu există standard Internațional pentru acest test.

### CONȚINUT

**Ref**  
OD297



<b>Microtitre Plate</b>		12 x 8 godeu x 1		
Godeuri detașabile "căpșușite" cu anticorpi specifici Plasate într-o pungă de folie care poate fi resigilată și care conține un desicant				
<b>Cal</b>	<b>A</b>	<b>0 U/ml</b>	2 ml	
Standard Referință: Ser uman fără Antigen Cancer 15-3. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Cal</b>	<b>B</b>	<b>15 U/ml</b>	2 ml	
Standard Referință: Antigen Cancer 15-3 diluat în ser uman. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Cal</b>	<b>C</b>	<b>30 U/ml</b>	2 ml	
Standard Referință: Antigen Cancer 15-3 diluat în ser uman. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Cal</b>	<b>D</b>	<b>60U/ml</b>	2 ml	
Standard Referință: Antigen Cancer 15-3 diluat în ser uman. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Cal</b>	<b>E</b>	<b>120U/ml</b>	2 ml	
Standard Referință: Antigen Cancer 15-3 diluat în ser uman. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Cal</b>	<b>F</b>	<b>240U/ml</b>	2 ml	
Standard Referință: Antigen Cancer 15-3 diluat în ser uman. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Conj</b>	<b>22X</b>		1 ml	
Concentrat de Conjugat Anticorpi anti-Antigen Cancer 15-3 și HRP: Concentrat Anti- Antigen Cancer 15-3 și peroxidază de hrean (incolor).				
<b>DIL</b>	<b>SPEC</b>		2 X 50ml	
Diluent Probă: Tampon pe bază de fosfat și care conține proteine de stabilizare. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>DIL</b>	<b>Conj</b>		21 ml	
Diluent Conjugat: Tampon pe bază de fosfat și care conține Proteine de stabilizare. Gata de lucru. (Roz)				
<b>Subs</b>	<b>TMB</b>		11 ml	
Soluție Substrat: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidină într-o soluție de tampon citrat. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Soln</b>	<b>Stop</b>	<b>HCl</b>	<b>1M</b>	11 ml
Soluție de Stopare: Acid clorhidric diluat în apă purificată. Gata de Lucru. (incolor)				
<b>Broșură de instrucțiuni și Fișă de înregistrare date EIA</b>			1 + 1	

### MATERIALE NECESARE DAR CARE NU SUNT PREZENTE ÎN KIT

Micropipete: 100µl, 200µl și 1000µl  
Vîrfuri de unică folosință pentru pipete  
Mixer Vortex  
Incubator: Temperatură: 37°C ± 1°C  
Hîrtie absorbantă  
Clitor microplăc cu filtru de 450nm.  
Hîrtie pentru grafic (milimetrică)  
Sticlărie de laborator foarte curată.

### PRECAUȚIUNI

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** conține materiale de origine umană care au fost testate și confirmate negative prin proceduri aprobate pentru anticorpi HCV, HIV I și II și pentru HbsAg, la nivel de donor unic. Deoarece nici un test nu poate oferi o garanție completă că produsele derivate din surse umane nu vor transmite agenți infecțioși, se recomandă ca reactivii din acest kit să fie manipulați cu grijă și atenția corespunzătoare atît în timpul utilizării cît și sunt deșeurii. Nu ingerați.

Reactivii **PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** nu conțin substanțe periculoase așa cum sunt definite de legislația Chimică a Marii Britanii (Informații și Ambalare substanțe periculoase pentru Furnizare). Toți reactivii trebuie totuși tratați ca substanțe cu potențial risc biologic atît cînd sunt folosite cît și cînd sunt deșeurii. Rezolvarea finală a deșeurilor trebuie făcută în conformitate cu legislația locală.

Soluția de Stopare pentru **PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** este acid clorhidric diluat și deci este corozivă. Manipulați cu atenție. În cazul în care vine în contact cu organismul uman, clătiți bine cu apă.

Reactivii **PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** conțin ca și conservant Proclin™ 300\* 1% care poate fi toxic dacă este ingerat. În cazul în care vine în contact cu organismul uman, clătiți bine cu apă și consultați un medic.

\* Proclin™ 300 este o marcă înregistrată ROHM & HAAS Limited.

### DEPOZITARE

Reactivii trebuie depozitați la temperaturi de 2°C - 8°C.

Data expirării este ultima zi a lunii menționate pe eticheta recipientului și pe ambalajul kit-ului. Performanța kit-ului va fi cea specificată pînă la data expirării menționată așa cum este determinată de la data producerii și după cum este menționat pe kit și componentele acestuia. Nu folosiți reactivii după data expirării.

Evitați expunerea reactivilor la temperatură excesivă. Nu expuneți reactivii la lumina directă a soarelui.

NU CONGELAȚI NICI UN REACTIV, deoarece acesta va fi iremediabil alterat.

### RECOLTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBEI

Recoltați o probă de sînge venos de la pacient și lăsați să se formeze și retracte cheagul. Centrifugați proba de sînge coagulat și colectați serul limpede. Este nevoie de ser proaspăt.

Nu folosiți ser hemolizat, contaminat sau lipemic pentru testare deoarece aceasta va influența nedorit rezultatele.

Serul poate fi depozitat la 2°C - 8°C timp de 48 de ore înainte de testare. Dacă este nevoie de o depozitare pe durată mai lungă, puteți păstra serul la -20°C pe o durată de pînă la un an. Probele decongelate trebuie amestecate înainte de testare.

Nu folosiți Azidă Sodică ca și conservant deoarece poate inhiba sistemul Enzimă peroxidază.

Nu congelați-decongelați repetat probele deoarece veți obține rezultate false.

### PREGĂTIREA REACTIVILOR

Toți reactivii trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei (20°C-25°C) și amestecați ușor înainte de a fi folosiți. Evitați formarea spumei.

Pentru a pregăti de lucru Conjugatul Anti-Antigen Cancer 15-3 HRP Conjugat, adăugați o parte de conjugat concentrat la 21 părți de diluent de conjugat (diluție 1/22): pentru fiecare godeu este nevoie de 200µl. Rectivul diluat este stabil la 2°C - 8°C timp de patru luni.

### LIMITELE UTILIZĂRII

Folosirea altor probe decît serul nu a fost validată pentru acest test. Nu există un protocol de re-utilizare pentru acest produs.

Atunci cînd faceți interpretarea acestui test este recomandat să luați în considerare toate datele clinice. Diagnosticul nu trebuie făcut pornind doar de la rezultatele unui singur test.

## PROCEDURA DE TESTARE

1. Aduceți toate componentele kit-ului și serul de testat la temperatura camerei (20°- 25°C) înainte de a începe testarea.
2. Se recomandă rularea unui set de standarde la fiecare lot de probe procesate. Fixați în suport numărul dorit de stripuri. Notați poziția standardelor și a serului de testat pe fișa de date de înregistrare a datelor EIA din kit.
3. Godeurile nefolosite trebuie re-sigilate din nou în punga de folie cu desicant înainte de a fi depozitate din nou la 2°C - 8°C.
4. Serul de testat trebuie diluat înainte de utilizare. Amestecați 20 $\mu$ l de ser de testat cu 100 $\mu$ l de diluent de probă. Standardele CA 15-3 sunt prediluate și gata de lucru.
5. Pipetați 200 $\mu$ l de standarde și probe diluate în godeurile stabilite și amestecați 10 secunde.
6. Incubați timp de 60 de minute la 37°C.
7. După perioada de incubare, aruncați conținutul godeurilor răsturnând brusc conținutul plăcii cu partea superioară în jos deasupra unui container de deșeuri cu risc biologic și apoi loviți placa (cu partea superioară în jos) pe o bucată de hirtie absorbantă. Aveți grijă ca în recipientul pentru deșeuri să se afle un dezinfectant corespunzător.
8. Spălare manuală: umpleți godeurile cu minimum 300 $\mu$ l de apă distilată pentru fiecare godeu. Aruncați conținutul plăcii în recipientul de deșeuri biologice.
9. Loviți apoi godeurile (răsturnate) de hirtie absorbantă pentru a îndepărta toate picăturile reziduale de lichid.
10. Spălare Automată: Asigurați-vă ca în fiecare godeu să fie dispensați 300 $\mu$ l și că în recipientul de deșeuri este adăugat un dezinfectant potrivit. Spălați godeurile goale de 5 ori. După spălare, îndepărtați lichidul restant prin lovirea godeurilor (inversate) de hirtie absorbantă.
11. Pipetați 200 $\mu$ l de Conjugat Anti-Antigen Cancer 15-3 și HRP în fiecare godeu și amestecați bine timp de 10 secunde.
12. Incubați placa 60 de minute la 37°C.
13. Spălați placa după cum este descris mai sus.
14. Pipetați 100 $\mu$ l de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați timp de 10 secunde.
15. Incubați la întuneric 20 de minute la temperatura camerei (20°- 25°C).
16. Opriti reacția prin adăugarea în fiecare godeu a 100 $\mu$ l de Soluție de Stopare.
17. Amestecați ușor timp de 30 de secunde pentru a asigura virarea completă a culorii la galben.
18. Citiți Densitatea Optică (DO) imediat (nu mai târziu de 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

## EVITAREA ERORILOR

Poate fi folosit de personalul cu minimă pregătire bazică de laborator.

Nu folosiți componente ale kit-ului care sunt deteriorate sau contaminate. Folosiți un vîrf de pipetă de unică folosință pentru fiecare probă pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Deși nu este necesară se recomandă rularea probelor și standardelor în duplicat.

Probele și standardele trebuie rulate simultan pentru a avea condiții de testare similare.

Se recomandă să nu folosiți mai mult de 32 de godeuri odată atunci cînd pipetați manual, deoarece pipetarea Standardelor și probelor trebuie să fie completă în decurs de 3 minute. Se poate folosi o placă completă de 96 de godeuri doar dacă este disponibilă pipetarea automată.

Puneți la loc capacul pe recipientele cu reactivi imediat după utilizare.

Evitați pipetarea repetată din reactivii de stoc, deoarece se poate produce contaminare.

Nu amestecați reactivii sau stripurile provenind de la kit-uri diferite. Atunci cînd pipetați aveți grijă să nu atingeți suprafața godeului. Nu pipetați reactivul pe partea laterală a godeului. Înainte de începutul testării, lăsați reactivii să ajungă la temperatura camerei (20°- 25°C). Amestecați ușor toți reactivii cu mișcări blînde de rotație.

Odată testarea pornită, godeurile nu trebuie să se usuce în cursul derulării testului.

Nu contaminați Soluția Substrat deoarece kit-ul va deveni nefuncțional.

Controlați precizia și acuratețea echipamentului de laborator folosit în timpul procedurii pentru a asigura rezultate reproductibile.

Strip-urile nefolosite ar trebui re-sigilate în punga de folie care conține desicant și apoi depozitate la 2°C - 8°C.

## CALCULAREA REZULTATELOR

Calculați valoarea absorbanței medii ( $A_{450}$ ) pentru fiecare set de standarde și probe. Creați o curbă standard făcînd un grafic cu absorbanta medie pentru fiecare standard în funcție de concentrația în Unități/ml pe hirtie milimetrică, cu valorile absorbantei pe axa Y și concentrațiile pe axa X. Folosiți valorile absorbantei medii pentru fiecare probă pentru a determina concentrația corespunzătoare de Antigen Cancer 15-3 în Unități/ml plecînd de la curba standard. Dacă nivelurile de controale sau probe cu niveluri cunoscute de utilizator nu dau rezultatele așteptate, rezultatele testului trebuie considerate invalide.

Dacă folosiți un pachet software alegeți o curbă de regresie quadratică care să se potrivească.

## VALORI PREDICȚIONATE ȘI SENSIBILITATE

Graficul produs de calibratori ar trebuie să aibă o formă hiperbolică cu DO450 (densitatea optică citită la 450nm) a calibratorilor proporțională cu concentrația lor. DO a calibratorului A trebuie să fie mai mică de 0,5 iar DO a calibratorului F mai mare de 1,1 pentru ca rezultatele testului să fie valide.

Femeile sănătoase ar trebui să aibă valori ale Antigenului Cancer 15-3 mai mici de 35 U/ml. Concentrația minimă detectabilă a Antigenului Cancer 15-3 pentru testul PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3 este estimată a fi de 5 U/ml.

## DATE DE EVALUARE

Test calibrat față de competiții majori și standarde interne.

Coefficientul de variație pentru PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3 este mai mic sau egal cu 10%.

În cursul unei evaluări dintre kit-ul Pathozyme CA 15-3 produs de Omega și kit-ul AxSym produs de Abbot, folosind probe cu niveluri între 8,0 U/ml și 2.000 U/ml au fost generate următoarele date.

Număr de probe	63
Coefficient de Corelație	0,97
Pantă	0,93
Intercept	10,2
Medie Omega	209,9 U/ml
Medie Abbott	197 U/ml

S-a dovedit că între aceste kit-uri există o bună corelație.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Aziz D. C.** Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analysis. *AJ. Clin. Pathol.* 1992;98:105-11.
2. **Aziz DC, Peter J. B.** DNA ploidy and cell cycle analysis. Tools for assessment of cancer prognosis. *J. Clin. Pathol.* 1991;5:422-38.
3. **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.
4. **Elledge RM, McGuire W. L.** Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu. Rev. Med.* 1993;44:201-10.
5. **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.
6. **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.
7. **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.
8. **McGuire WL, Tandon AK, Allred 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.
9. **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.
10. **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.
11. **Ueronese S, Gambocorta M.** Detection of Ki-67 rate in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991;95:30-4.
12. **Lotnicker M, Pavesi F, Scarabelli M.** Tumour associated antigens CA-15-3 and CA-125 in ovarian cancer. *Int. J. Biolog. Markers* 1991;6:115.

## GHID RAPID AL PROCEDURII DE TESTARE

1. Pipetați 200 $\mu$ l de Standarde sau probe diluate în fiecare godeu și amestecați bine timp de 10 secunde.
2. Incubați timp de 60 minute la 37°C.
3. Aruncați conținutul godeurilor și spălați de 5 ori cu apă distilată.
4. Pipetați 200 $\mu$ l de Conjugat Enzimă 1/22 în fiecare godeu. Amestecați ușor 10 secunde.
5. Incubați 60 minute la 37°C.
6. Aruncați conținutul godeurilor și spălați de 5 ori cu apă distilată.
7. Pipetați 100 $\mu$ l de Substrat TMB. Amestecați ușor timp de 10 secunde.
8. Incubați la întuneric 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
9. Adăugați 100 $\mu$ l de Soluție de Stopare în fiecare godeu și amestecați bine timp de 30 de secunde.
10. Citiți imediat densitatea optică (nu mai târziu de 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450 nm.

8079 ISSUE 5A Revised January 2007. ROMANIAN  
© Omega Diagnostics Ltd 2007.



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