НАБІР РЕАГЕНТІВ

ОНКОМАРКЕР CA15-3 ELISA

TM-CA 15-3 ELISA

Кат. №: ***EIA-5068*** *Дата випуску інструкції:* ***2018/11***
Версія ***4.0***

Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1 ВСТУП

1.1 Призначення

Набір **DRG TM-CA 15-3 ELISA** - це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro діагностичного* визначення CA15-3 у сироватці та плазмі (ЕДТА-, гепарин- або цитратна плазма).

1.2 Резюме та пояснення

Рак молочної залози є однією з найбільш поширених злоякісних новоутворень серед жінок. Дев'ять категорій пухлини молочної залози показали клінічну корисність і були рекомендовані до застосування на практиці. Серед них CA 15-3, який виявляє розчинні форми білка MUC-1, є найбільш широко використовуваним сироватковим маркером у пацієнтів з раком молочної залози (1-6). Основне застосування CA 15-3 полягає в моніторингу терапії у пацієнтів з метастатичним захворюванням (1, 11). Метастатичне захворювання може бути присутнім під час первинної діагностики і може відбуватися в будь-який час після первинної терапії. До 70% пацієнтів з метастазами реагують на системне лікування цитотоксичними препаратами або ендокринною терапією; тому виявлення рецидивів на ранній стадії є важливим для ведення пацієнтів (7). У пацієнтів, які раніше отримували лікування раку молочної залози на II або III стадії, раннє виявлення рецидиву не може бути легко здійснено шляхом звичайних клінічних або діагностичних досліджень. Використання циркулюючого аналізу сироваткового маркера пухлини, такого як ELISA DRG TM-CA 15-3, може бути корисним при ідентифікації цих пацієнтів. Крім того, CA 15-3 також може бути використаний в післяопераційному спостереженні безсимптомних жінок, які зазнали операції на інвазивний рак молочної залози (1,8). Нарешті, передопераційні концентрації CA 15-3 можуть поєднуватися з існуючими прогностичними факторами для прогнозування результату у пацієнтів з вперше виявленим раком молочної залози (9).

CA 15.3, хоча переважно пов'язаний з раком молочної залози, не є специфічним для тканини, і було показано, що він підвищений у різних сортах, таких як рак яєчників і аденокарцинома товстої кишки (9). значення CA 15-3 не були підвищені в сироватках більшості нормальних індивідуумів або у осіб з незлоякісними станами (10, 11).

ПРИМІТКА: значення CA 15-3, визначені при різних тестах і від різних виробників, можуть змінюватися внаслідок відмінностей у методах аналізу і специфічності реагенту. Результати, які отримав лікар від лабораторії, повинні включати ідентичність використовуваного аналізу. Значення аналізу, отримані при різних методах аналізу, не можуть використовуватися як взаємозамінні. Крім того, основним обмеженням CA 15-3 як маркера раку молочної залози є те, що рівні сироватки рідко зростають у пацієнтів з раннім або локалізованим захворюванням (1).

2 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Даний аналіз є імуноферментним аналізом (ІФА), заснованим на **принципі сендвіча.**

Мікротитрові лунки покриті моноклональним антитілом (миші) до антигенних сайтів на молекулі CA15-3.

Аліквота зразка пацієнта, який містить ендогенний CA15-3, інкубується в лунці з нанесеним ферментним кон'югатом, який є анти-CA15-3 антитілом, кон'югованим з пероксидазою хрону. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається.

Кількість зв'язаної пероксидази пропорційна концентрації CA15-3 у зразку.

Після додавання розчину субстрату, інтенсивність кольору, що розвивається, пропорційна концентрації CA15-3 у зразку пацієнта.

3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in-vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
2. Всі реагенти тестового набору, які містять людську сироватку або плазму тестували і дослідили, що вони є негативними до ВІЛ I/II, HbsAg та HCV схваленими методами FDA.
3. Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °C запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
5. Піпетування зразків та реагентів потрібно проводити якомога швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
7. Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення промивання.
9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °C) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності. Проте на значення зразків пацієнта це не впливає.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток та мікропланшетних зчитувачів.
16. Не змішуйте реагенти різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Уникати контакту зі *Стоп-розчином*, що містить 0.5 M H_2SO_4. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. При попаданні в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. ТМБ субстрат має подразнюючий вплив на шкіру та слизову. У випадку контакту, промийте очі з достатньою кількістю води, а шкіру – милом та великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. У випадку вдихання, вивести людину на чисте повітря.
20. Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4 РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. ***Мікротитраційні лунки:*** 12 x 8 (відривних) смужок, 96 лунок;
   Лунки покриті моноклональними анти-CA15-3 антитілами.
2. ***Нульовий Стандарт,*** 1 флакон, 3 мл, готовий до використання;
   Містить не-ртутний консервант.
3. ***Стандарт (Стандарти 1-4):*** 4 флакони, 0.5 мл, готові до використання;
   Концентрації: 25-50-100-200 О/мл.
   Містить не-ртутний консервант.
4. ***Контроль Низький та Високий:*** 2 флакони, 0.5 мл кожен, ліофілізовані;
   див. «Підготовка реагентів»
   Значення і діапазони дивіться на етикетці флакона або паспорті якості.
   Містить не-ртутний консервант.
5. ***Буфер для аналізів,*** 1 флакон, 30 мл, готовий до використання:
   Містить не-ртутний консервант.
6. ***Ферментний кон'югат***, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання,
   Анти-CA 15-3, кон'югований з пероксидазою хрону.
   Містить не-ртутний консервант.

7. ***Розчин субстрату,*** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання.
   Тетраметилбензидин (ТМБ)
8. ***Стоп-розчин,*** 1 флакон, 14 мл, готовий до використання,
   Містить 0.5 M H_2SO_4,
   Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може спричинити подразнення шкіри або опіки.
9. ***Промивний Розчин,*** 1 флакон, 30 мл (40Х концентрат).
   Див. «Приготування реагентів»

Примітка: Додатково *Нульовий Стандарт* для розведення зразків доступний за запитом.

4.2 Матеріали, що не постачаються, але необхідні
- Мікротитровий відкалібрований рідер (450 нм±10 нм).
- Відкалібровані змінні прецизійні мікропіпетки.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Таймер.
- Напівлогарифмічний графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання
За умови зберігання при температурі 2-8 °С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.
Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8 °С.
Після відкривання мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір залишається стабільним протягом 8 тижнів за умови зберігання, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів
Перед використанням, доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Контроль
Відновіть ліофілізований вміст з 0.5 мл дистильованої води та дайте постояти мінімум 10 хвилин. Перемішайте контролі кілька разів перед використанням.
Примітка: *Відновлені контролі стабільні протягом 2 днів при температурі від 2 °С до 8 °С.*
Для тривалого зберігання відновлені контролі слід поділити на порції та зберігати при -20 °С.

Промивний розчин
Додайте деіонізовану воду до 40х концентрованого Промивного Розчину.
Розведіть 30 мл концентрованого *Промивного Розчину* з 1170 мл деіонізованої води до об'єму 1200 мл.
Розведений Промивний Розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.

4.5 Утилізація набору
Утилізація набору повинна проводитись відповідно до вимог місцевого регулювання. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкоджені набори
При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Сильно пошкоджені компоненти не слід використовувати у тестуванні. Вони повинні зберігатись до вирішення проблеми. Після цього їх потрібно утилізувати відповідно до вимог місцевого регулювання.

5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ
У цьому дослідженні можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА, гепаринову або цитратну плазму).
Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.
Увага: зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

5.1 Забір зразків
Сироватка:
Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте крові згорнутись і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для згортання крові.

Плазма:
Цільну кров слід збирати в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянти (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідним препаратом для плазми) та центрифугувати відразу ж після збору.

5.2 Підготовка та зберігання зразків
Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при температурі 2-8 °С до 48 годин перед дослідженням.
Для тривалого зберігання (мінімум, 6 місяців) зразки повинні бути заморожені до -20 °С. Після відтавання зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків
Якщо при початковому аналізі зразок показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені *0 Стандартом* і проаналізовані повторно.
Для вирахування концентрацій необхідно брати до уваги коефіцієнт розведення.
Приклад:
a) Розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл *0 Стандарту* (ретельно змішайте)
b) Розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл *0 Стандарту* (ретельно змішайте).

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ
6.1 Загальні зауваження
- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, всі необхідні лунки закріплені у тримачі та інше. Це дозволить проводити всі кроки за одинакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура аналізу
Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитровий лунок у штативі.
2. Додайте по **10 мкл** кожного ***Стандарту/Контролю*** та ***зразків*** у відповідні лунки кожен раз з новою насадкою.
3. Внесіть в кожну лунку по **250 мкл *Буферу для аналізу***.
   Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. Важливо добре перемішати на цьому етапі.
4. Інкубуйте протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Видаліть вміст лунок.
   Промийте лунки **4 рази** розведеним *Промивним Розчином* (400 мкл на лунку). Видалити з лунок залишки рідини на абсорбуючий папір.
   Важлива примітка:
   На чутливість та точність цього аналізу помітно впливає правильність виконання процедури промивання!
6. Додайте по **100 мкл *Ферментного Кон'югату*** в кожну лунку.
7. Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **4 рази** розведеним *Промивним Розчином (400 мкл).* Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
9. Додайте **100 мкл *Розчину Субстрату*** в кожну лунку.
10. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
11. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл *Стоп-Розчину*** в кожну лунку.
12. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10** нм за допомогою мікротитровий планшет-рідера. Рекомендується, проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання *Стоп-Розчину*.

6.3 Розрахунок результатів
1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Ручний метод: побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на вертикальній осі (У) проти відповідних концентрацій на горизонтальній осі (Х).
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.

4. Автоматичний метод:, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
5. Концентрацію зразків можна зчитати зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити або вважати як > 200 О/мл. При вирахуванні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої
Наступні дані наведені тільки для демонстрації і **не можуть** використовуватися для отримання результатів під час аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 О/мл)	0.02
Стандарт 1 (25 О/мл)	0.45
Стандарт 2 (50 О/мл)	0.82
Стандарт 3 (100 О/мл)	1.43
Стандарт 4 (200 О/мл)	2.03

7 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ
Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

У дослідженні, проведеному на 77 зразках нормальних здорових дорослих пацієнтів, використовуючи набір DRG TM-CA15-3 ІФА, були отримані наступні дані.

Population	N	Mean (U/mL)	Median (U/mL)	5th Percentile (U/mL)	95th Percentile (U/mL)
Healty females and males	77	17.28	16.80	10.12	24.42

Для пацієнтів без ознак захворювання (11, 12, 13) рекомендується значення cut-off від 25 до 40 О/мл.
Результати аналізу не можуть бути єдиною причиною для терапевтичного висновку. Результат повинен корелювати з іншими клінічними дослідженнями і діагностичними тестами.

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ
Рекомендується, використовувати контролі відповідно до державних і місцевих правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі як нормального рівня так і патологічного.
Контролі и відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті, відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.
Також рекомендується використовувати національні и міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.
Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають у встановлені границі матеріалів контролю, результати є не достовірними.
В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації и промивання.
Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
9.1 Динамічний діапазон аналізу
Діапазон аналізу знаходиться між 0.50 - 200 О/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)
Перехресна реакція аналізу не відома.

9.3 Чутливість
Аналітична чутливість DRG ELISA була обчислена додавши 2 стандартних відхилення до середнього значення 20 повторів аналізу *стандарту 0* і склала 0.50 О/мл.

9.4 Відтворюваність
9.4.1 Варіативність в аналізі

Зразок	N	Середнє, О/мл	КВ, %
1	20	2.8	7.0
2	20	16.1	9.7
3	20	24.5	5.2

9.4.2 Варіативність між аналізами

Сироватка	К-сть	Середнє, О/мл	КВ, %
1	40	3.1	14.5
2	40	17.7	10.1
3	40	19.2	7.7

9.5 Відновлення
Зразки були насичені шляхом додавання розчинів CA15-3 з відомими концентраціями у співвідношенні 1:1.
Відновлення у % розраховується шляхом множення співвідношення виміряних та очікуваних величин на 100 (очікуване значення = (ендогенний CA15-3 + доданий CA15-3)/2; через розбавлення сироватки 1:2 з матеріалом насичення).

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [U/mL]		11.9	31.9	18.0
Average Recovery		87.6	90.6	102.3
Range of Recovery [%]	from	85.1	85.0	85.5
	to	90.5	96.3	114.9

9.6 Лінійність

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [U/mL]		24.7	23.5	21.6
Average Recovery		95.5	94.9	106.9
Range of Recovery [%]	from	87.4	88.5	103.7
	to	103.6	102.1	111.1

10 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ
Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура дослідження проводитиметься з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.
Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини
Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл).
Набір містить реагенти для мінімізації інтерференції HAMA та гетерофільних антитіл. Проте, надзвичайно високі титри HAMA або гетерофільні антитіла можуть заважати результатам тестів.

10.2 Вплив лікарських засобів
На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання CA15-3 у зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози
Не спостерігалося хук-ефекту в цьому дослідженні до 12 800 О/мл CA15-3.

11 ПРАВОВІ АСПЕКТИ
11.1 Достовірність результатів
Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати, в рамках процедури тестування, достатню кількість контролів для перевірки точності та достовірності тесту.
Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури. У разі будь-яких сумнів звертайтеся до DRG.

11.2 Терапевтичні заключення
Терапевтичні висновки не повинні базуватись тільки на результатах лабораторії і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.
Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта. Результат тесту не повинен бути єдиним детермінантом для терапевтичних висновків.

11.3 Відповідальність
Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може

негативно відображатись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.
Виробник не несе відповідальності за будь-які пошкодження набору під час транспортування.

ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drg@drg-diagnostics.de

УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua