



EL

# CanAg CA15-3 EIA

REF 200-10

Οδηγίες χρήσης  
2009-06

Κιτ δοκιμής ενζυματικής ανοσομέτρησης  
για 96 προσδιορισμούς

## ΣΚΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Το κιτ CanAg CA15-3 EIA προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του καρκινικού αντιγόνου MUC-1 (CA15-3) στον ορό.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το αντιγόνο MUC-1 είναι μια γλυκοπρωτεϊνική βλεννίνη με πρόσδεση σε μεμβράνη που υπάρχει σε καλοήγη και φυσιολογικά επιθήλια ορισμένων οργάνων, π.χ. μαστό, πνεύμονα, ωθήκη, πάγκρεας και παχύ έντερο (1). Η αποπρωτεΐνη της βλεννίνης MUC-1 περιέχει ένα διαμεμβρανικό τμήμα, ένα κυτταροπλασματικό τμήμα και ένα εξωκυτταρικό τμήμα εμπλουτισμένο με υδατάνθρακες. Το εξωκυτταρικό τμήμα χαρακτηρίζεται από πολυμορφισμό όσον αφορά τον αριθμό των 20 αμινοξικών επαναληπτικών αλληλουχιών (πολυμορφισμός VNTR). Η CanAg CA15-3 EIA βασίζεται σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, το προσελκύνον αντίσωμα Ma695 που στοχεύει ένα σιελοποιημένο υδατανθρακικό επίτοπο που εκφράζεται στο αντιγόνο MUC-1 και το ανιχνεύον αντίσωμα Ma552 που στοχεύει την περιοχή PDTRPAPG του πρωτεϊνικού πυρήνα (2-5).

Η βλεννίνη καρκίνου του μαστού MUC-1 (αντιγόνο CA15-3) εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα και είναι ένας καλά καθιερωμένος ορολογικός δείκτης για την παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού (6).

## ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η CanAg CA15-3 EIA είναι μια ανοσολογική μη-ανταγωνιστική δοκιμή στέρεας φάσης, η οποία βασίζεται στην άμεση τεχνική τύπου σάντουιτς. Οι βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα ασθενούς επωάζονται μαζί με βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CA15-3 και σύζευγμα μονοκλωνικού αντισώματος anti-CA15-3 και υπεροξειδάσης από ραφανίδα (HRP-

labelled) σε βοθρία με επικάλυψη στρεπταβιδίνης. Μετά την πλύση, το ρυθμιστικό αντιδραστήριο υποστρώματος/χρωμογόνου (υπεροξειδίο του υδρογόνου και 3, 3', 5, 5' τετραμεθυλοβενζιδίνη) προστίθεται σε κάθε βοθρίο και επιτρέπεται να προχωρήσει η αντίδραση ενζύμου. Κατά την αντίδραση ενζύμου, εμφανίζεται μπλε χρώμα παρουσία αντιγόνου. Η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη προς την ποσότητα CA15-3 στα δείγματα.

Η ένταση του χρώματος προσδιορίζεται σε φασματοφωτόμετρο μικροπλάκων σε μήκος κύματος 620 nm (ή προαιρετικά σε μήκος κύματος 405 nm μετά την προσθήκη διαλύματος τερματισμού). Οι καμπύλες βαθμονόμησης δημιουργούνται για κάθε δοκιμή με τη γραφική αναπαράσταση των τιμών απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης για κάθε βαθμονομητή. Οι συγκεντρώσεις CA15-3 στα δείγματα ασθενούς λαμβάνονται από την καμπύλη βαθμονόμησης.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Κάθε kit CanAg CA15-3 EIA περιέχει αντιδραστήρια για 96 δοκιμές.
- Η ημερομηνία λήξης του kit αναγράφεται στην ετικέτα, στο εξωτερικό της συσκευασίας του kit.
- Μην χρησιμοποιήσετε το kit μετά την ημερομηνία λήξης.
- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες kit.
- Αποθηκεύστε τα kit σε θερμοκρασία 2–8°C. Μην καταψύχετε.
- Τα ανοιγμένα αντιδραστήρια είναι σταθερά σύμφωνα με τον πίνακα παρακάτω, με την προϋπόθεση ότι δεν έχουν μολυνθεί, αποθηκευθεί σε επανασφραγισμένα αρχικά δοχεία και ότι ο χειρισμός γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες. Πρέπει να γίνει επαναφορά σε θερμοκρασία 2-8°C αμέσως μετά τη χρήση.

---

Συστατικό	Ποσότητα	Αποθήκευση και σταθερότητα μετά το πρώτο άνοιγμα
-----------	----------	--

---

### MICROPLA

Μικροπλάκα	1 πλάκα	2–8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην πλάκα
------------	---------	---

12 x 8 αποσπώμενα βοθρία με επικάλυψη στρεπταβιδίνης. Μετά το άνοιγμα, επιστρέψτε αμέσως τα αχρησιμοποιητά βοθρία στο αλουμινένιο δοχείο που περιέχει αφυγραντικό και σφραγίστε ξανά προσεχτικά για να διατηρηθούν στεγνά.

---

Συστατικό	Ποσότητα	Αποθήκευση και σταθερότητα μετά το πρώτο άνοιγμα
-----------	----------	--

**Βαθμονομητές CA15-3** 5 φιαλίδια 2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στα φιαλίδια

CAL	CA15-3	0	0 U/mL	1 x 0,75 mL
-----	--------	---	--------	-------------

CAL	CA15-3	15	15 U/mL	1 x 0,75 mL
-----	--------	----	---------	-------------

CAL	CA15-3	50	50 U/mL	1 x 0,75 mL
-----	--------	----	---------	-------------

CAL	CA15-3	125	125 U/mL	1 x 0,75 mL
-----	--------	-----	----------	-------------

CAL	CA15-3	250	250 U/mL	1 x 0,75 mL
-----	--------	-----	----------	-------------

Αντιγόνο MUC-1 σε αλατούχο ρυθμισμένο με Tris-HCl που περιέχει λευκωματίνη βόειου ορού, αδρανή κίτρινη βαφή και 0,01 % μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Έτοιμο για χρήση.

**Υλικά ελέγχου CA15-3** 2 φιαλίδια 2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στα φιαλίδια

CONTROL	CA15-3	1	1 x 0,75 mL
---------	--------	---	-------------

CONTROL	CA15-3	2	1 x 0,75 mL
---------	--------	---	-------------

Αντιγόνο MUC-1 σε αλατούχο ρυθμισμένο με Tris-HCl που περιέχει λευκωματίνη βόειου ορού και 0,01 % μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Έτοιμο για χρήση.

BIOTIN	Anti-CA15-3
--------	-------------

**Anti-CA15-3 βιοτίνης** 1 x 15 mL 2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο

Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CA15-3 βιοτίνης από ποντίκι, περίπου 2,5 µg/mL. Περιέχει φυσιολογικό ορό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (pH 7,2) με λευκωματίνη βόειου ορού, βόεια ανοσοσφαιρίνη, ανασταλτικούς παράγοντες, απορροπταντικά, αδρανή μπλε βαφή και 0,01% μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Να αναμειχθεί με ιχνηθέτη HRP anti-CA15-3 πριν από τη χρήση.

Συστατικό	Ποσότητα	Αποθήκευση και σταθερότητα μετά το πρώτο άνοιγμα
-----------	----------	--

<b>CONJ</b>	<b>Anti-CA15-3</b>
-------------	--------------------

**Ιχνηθέτης, HRP anti-CA15-3** 1 x 0,75 mL

2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο

Μητρικό διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος HRP anti-CA15-3 από ποντίκι, κατά προσέγγιση 50 µg/mL. Περιέχει συντηρητικά. Να αναμειχθεί με anti-CA15-3 βιοτίνης πριν από τη χρήση.

<b>DIL</b>	<b>SPE</b>
------------	------------

**Αραιωτικό δείγματος**

2 x 50 mL

2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στη φιάλη

Αλατούχο ρυθμισμένο με Tris-HCl που περιέχει λευκωματίνη βόειου ορού, αδρανή κίτρινη βαφή και 0,01 % μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Έτοιμο για χρήση.

Μπορείτε να λάβετε πρόσθετο αραιωτικό δείγματος με παραγγελία του προϊόντος: "Sample Diluent CA15-3 EIA", κωδικός παραγγελίας 200-24, που περιέχει 50 mL.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

**TMB υποστρώματος HRP**

1 x 12 mL

2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο

Περιέχει ρυθμιστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου και 3, 3', 5, 5' τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB). Έτοιμο για χρήση.

<b>STOP</b>
-------------

**Διάλυμα τερματισμού**

1 x 15 mL

2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο

Περιέχει 0,12 M υδροχλωρικού οξέος. Έτοιμο για χρήση.

<b>WASHBUF</b>	<b>25X</b>
----------------	------------

**Συμπύκνωμα πλύσης**

1 x 50 mL

2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στη φιάλη

Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα με Tris-HCl με Tween 20. Περιέχει Germall II ως συντηρητικό. Να αραιωθεί με νερό 25 φορές πριν από τη χρήση.

## **Ενδείξεις αστάθειας**

Το TMB υποστρώματος HRP θα πρέπει να είναι άχρωμο ή ελαφρώς κυανόχρουν. Το μπλε χρώμα δηλώνει ότι το αντιδραστήριο έχει μολυνθεί και θα πρέπει να απορριφθεί.

## **ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

- Για επαγγελματική χρήση μόνο.
- Ανατρέξτε στη δημοσίευση αρ. (CDC) 88-8395 του Υπουργείου Υγείας και Ανθρώπινων Υπηρεσιών των ΗΠΑ (Bethesda, Md., US) σχετικά με την ασφάλεια στο εργαστήριο και άλλους τοπικούς ή εθνικούς κανονισμούς.
- Χειριστείτε όλα τα δείγματα ασθενούς σαν να ήταν εν δυνάμει μολυσματικά.
- Ακολουθήστε τις τοπικές κατευθυντήριες οδηγίες για την απόρριψη των αποβλήτων.

## **Προσοχή**

Το υλικό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή αντιδραστηρίου ανθρώπινης προέλευσης έχει δοκιμαστεί και βρέθηκε ότι δεν αντιδρά για το αντίσωμα έναντι του HIV-1/2, το αντίσωμα έναντι της Ηπατίτιδας C (HCV) και το αντιγόνο επιφανείας Ηπατίτιδας Β (HBsAg). Καθώς καμία μέθοδος δεν μπορεί να αποκλείσει εντελώς την παρουσία αιματογενώς μεταδιδόμενων νοσημάτων, ο χειρισμός και η απόρριψη των αντιδραστηρίων ανθρώπινης προέλευσης από αυτό το προϊόν θα πρέπει να γίνεται σαν να ήταν εν δυνάμει μολυσματικά.

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Η CanAg CA15-3 EIA προορίζεται για χρήση με τον ορό. Συλλέξτε το αίμα με φλεβοκέντηση και διαχωρίστε τον ορό ακολουθώντας τις τυπικές διαδικασίες. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευθούν στους 2—8°C για 24 ώρες. Για μεγαλύτερες περιόδους, αποθηκεύστε τα δείγματα σε θερμοκρασία -70°C ή χαμηλότερη. Τα σωληνάκια που περιέχουν γέλη δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για μακροχρόνια αποθήκευση. Τα δείγματα θα πρέπει να αποθηκεύονται σε καταψύκτη με αυτόματη απόψυξη και δεν πρέπει να γίνεται απόψυξη και μετά κατάψυξη πριν από την ανάλυση. Η απόψυξη των κατεψυγμένων δειγμάτων πρέπει να γίνεται αργά στους 2—8°C κατά τη διάρκεια της νύχτας και, στη συνέχεια, τα δείγματα πρέπει να αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου πριν από την ανάλυση.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Υλικά που απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται στο kit

#### 1. Αναδευτήρας μικροπλακών

Η ένταση της ανάδευσης πρέπει να είναι μέτρια έως δυνατή. Κατά μήκος ανάδευση με 200 διαδρομές/min, ταλαντώσεις 700-900/min κατά προσέγγιση.

#### 2. Συσκευή πλύσης μικροπλάκας

Αυτόματη συσκευή πλύσης πλάκας που εκτελεί 1 και 6 κύκλους πλύσης με ελάχιστο όγκο πλήρωσης 350 μL/βοθρίο/κύκλο πλύσης.

Συνιστάται το μη αυτόματο πλυτικό βοθρίων Nunc Immuno-8 αν δεν χρησιμοποιείται αυτόματη συσκευή πλύσης μικροπλάκας.

#### 3. Φασματοφωτόμετρο μικροπλακών

Με μήκος κύματος 620 nm ή/και 405 nm και περιοχή απορρόφησης 0 έως 3,0.

#### 4. Πιπέτες ακριβείας

Με αναλίσσιμα πλαστικά ρύγχη για την παροχή όγκων σε μικρολίτρα και χιλιοστόλιτρα.

Είναι χρήσιμη, αλλά όχι απαραίτητη, πιπέτα 8 καναλιών ή πιπέτα διανομής με αναλίσσιμα πλαστικά ρύγχη για την παροχή 100 μL.

#### 5. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Για προετοιμασία του διαλύματος πλύσης.

### Σημειώσεις διαδικασίας

1. Απαιτείται πλήρης κατανόηση του ένθετου σε αυτό το πακέτο για να διασφαλιστεί η σωστή χρήση του kit CanAg CA15-3 EIA. Τα αντιδραστήρια που παρέχονται με το kit, προορίζονται για χρήση ως ενιαία μονάδα. Μην αναμειγνύετε πανομοιότυπα αντιδραστήρια από kit με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια kit μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο εξωτερικό της συσκευασίας του kit.
2. Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου (20–25°C) πριν από τη χρήση. Η δοκιμή θα πρέπει να διεξαχθεί μόνο σε θερμοκρασίες μεταξύ 20–25°C για την απόκτηση αποτελεσμάτων ακριβείας. Τα κατεψυγμένα δείγματα θα πρέπει να αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου αργά και να αναμειχθούν με απαλές κινήσεις μετά την απόψυξη.
3. Πριν ξεκινήσετε τη χορήγηση βαθμονομητών, υλικών ελέγχου και δειγμάτων ασθενούς με πιπέτα, συνιστάται να σημειώσετε τα βοθρία ώστε να μπορέσετε να αναγνωρίσετε τα δείγματα πριν και μετά τη δοκιμή.

4. Η απαίτηση για επιμελή και διεξοδική πλύση για διαχωρισμό του δεσμευμένου και μη δεσμευμένου αντιγόνου και των αντιδραστηρίων από τα συμπλέγματα δεσμευμένων αντισωμάτων-αντιγόνων στέρεας φάσης είναι ένα από τα σημαντικότερα βήματα σε μια ΕΙΑ. Για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική πλύση, βεβαιωθείτε ότι όλα τα βοθρία πληρούνται πλήρως με διάλυμα πλύσης κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου πλύσης, ότι το διάλυμα πλύσης παρέχεται με καλή ροή, ότι η αναρρόφηση των βοθρίων μεταξύ και μετά τους κύκλους πλύσης είναι πλήρης και ότι τα βοθρία είναι κενά. Αν έχει απομείνει υγρό, αναστρέψτε την πλάκα και χτυπήστε την προσεχτικά πάνω σε απορροφητικό χαρτί.
  - Αυτόματο πλυστικό βοθρίων: Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για τον ενδεδειγμένο καθαρισμό και τη συντήρηση. Πλύντε με τον απαραίτητο αριθμό κύκλων πλύσης πριν και μετά από κάθε βήμα επώασης. Συνιστάται η χρήση του τρόπου επεξεργασίας ανά strip και του τρόπου πλύσης με *υπερχείλιση* με παροχή όγκου 800 μL. Η συσκευή αναρρόφησης/πλύσης δεν πρέπει να παραμένει με το διάλυμα πλύσης για μεγάλες περιόδους, καθώς οι βελόνες μπορεί να φράξουν, με αποτέλεσμα ανεπαρκή παροχή και αναρρόφηση υγρού.
5. Το TMB υποστρώματος HRP είναι πολύ ευαίσθητο σε μόλυνση. Για βέλτιστη σταθερότητα του TMB υποστρώματος HRP, χύστε την απαραίτητη ποσότητα από το φιαλίδιο σε διεξοδικά καθαρισμένο δοχείο ή κατά προτίμηση σε αναλώσιμο πλαστικό δίσκο, για αποφυγή μόλυνσης του αντιδραστηρίου. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη πιπέτων (ή ρύγχος πιπέτας διανομής).
6. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε καθαρά αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη πιπέτας και κατάλληλη τεχνική για παροχή με πιπέτα κατά το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων. Αποφύγετε τη μεταφορά υλικού κρατώντας το ρύγχος της πιπέτας ελαφρώς πάνω από την κορυφή του βοθρίου και αποφύγετε να αγγίξετε το πλαστικό βοθρίο ή την επιφάνεια του υγρού. Η κατάλληλη τεχνική παροχής με πιπέτα είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά το χειρισμό του TMB υποστρώματος HRP.

---

**Παρασκευή αντιδραστηρίων****Σταθερότητα του παρασκευασμένου αντιδραστηρίου**

---

**Διάλυμα πλύσης**

2 εβδομάδες στους 2–25°C  
σε σφραγισμένο δοχείο

Χύστε το συμπύκνωμα πλύσης 50 mL σε καθαρό δοχείο και αραιώστε 25 φορές με την προσθήκη 1200 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.

---

**Διάλυμα αντισώματος**

3 εβδομάδες στους 2–8°C  
σε σφραγισμένο δοχείο

Προετοιμάστε την απαραίτητη ποσότητα διαλύματος αντισώματος αναμειγνύοντας 50 μL ιχνηθέτη HRP anti-CA15-3 με 1 mL anti-CA15-3 βιοτίνης ανά strip (δείτε τον πίνακα παρακάτω και το φύλλο πρωτοκόλλου).

---

Αρ. βοθρίων	Ιχνηθέτης, HRP anti-CA15-3 (μL)	Anti-CA15-3 βιοτίνης (mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί καθαρή πλαστική ή γυάλινη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος αντισώματος.

**Εναλλακτική:** Χύστε το περιεχόμενο του ιχνηθέτη HRP anti-CA15-3 στο φιαλίδιο του anti-CA15-3 βιοτίνης και αναμείξτε απαλά. Βεβαιωθείτε ότι όλος ο ιχνηθέτης HRP anti-CA15-3 μεταφέρεται στο φιαλίδιο του αντισώματος anti-CA15-3 βιοτίνης.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Το διάλυμα αντισώματος είναι σταθερό για 3 εβδομάδες στους 2–8°C. Μην παρασκευάσετε περισσότερο διάλυμα αντισώματος από την ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί εντός αυτής της περιόδου και βεβαιωθείτε ότι έχει αποθηκευθεί σωστά.

## Διαδικασία δοκιμής

Πραγματοποιήστε κάθε προσδιορισμό δύο φορές για βαθμονομητές, υλικά ελέγχου και δείγματα ασθενούς. Η کاملή βαθμονόμηση θα πρέπει να εκτελείται με κάθε δοκιμή. Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να αποκοτούν τη θερμοκρασία δωματίου (20–25°C) πριν από τη χρήση.

- Ξεκινήστε με την παρασκευή του διαλύματος πλύσης και του διαλύματος αντισώματος. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία. Ακολουθήστε τις οδηγίες με προσοχή.
- Αραιώστε τα δείγματα ορού σε αναλογία 1:41 αναμιγνύοντας 25 μL δείγματος με 1 mL αραιωτικού δείγματος. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Οι βαθμονομητές CA15-3 και τα υλικά ελέγχου CA15-3 1 και 2 **δεν** πρέπει να αραιωθούν.
- Μεταφέρετε τον απαιτούμενο αριθμό βοθρίων σε ένα πλαίσιο βοθρίων. (Τοποθετήστε αμέσως τα υπόλοιπα βοθρία στο αλουμινένιο δοχείο που περιέχει αφυγραντικό και σφραγίστε ξανά με προσοχή). Πλύντε κάθε βοθρίο μία φορά με το διάλυμα πλύσης. Μην πλύνετε περισσότερα βοθρία από όσο είναι δυνατόν σε 30 λεπτά.
- Χορηγήστε με πιπέτα 25 μL των βαθμονομητών CA15-3 (CAL 0, 15, 50, 125, 250), των υλικών ελέγχου (C1, C2) και των αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς (άγνωστα-Unk) στα βοθρία σύμφωνα με το παρακάτω σχέδιο:

	1	2	3	4	5	6	7 κ.λπ.
A	Cal 0	Cal 250	Unk 2				
B	Cal 0	Cal 250	Unk 2				
C	Cal 15	C1	κ.λπ.				
D	Cal 15	C1					
E	Cal 50	C2					
F	Cal 50	C2					
G	Cal 125	Unk 1					
H	Cal 125	Unk 1					

- Προσθέστε 100 μL διαλύματος αντισώματος σε κάθε βοθρίο με τη χρήση πιπέτας ακριβείας 100 μL (ή πιπέτας ακριβείας 100 μL με 8 κανάλια). Αποφύγετε τη μεταφορά υλικού κρατώντας το ρύγχος της πιπέτας ελαφρώς πάνω από την κορυφή του βοθρίου και αποφύγετε να αγγίξετε τα πλαστικά βοθρία ή την επιφάνεια του υγρού.

# Φύλλο Πρωτοκόλλου

**CanAg CA15-3 EIA** REF **200-10**

Αναμίξτε τα συστατικά ακριβώς πριν από τη χρήση. Χρησιμοποιήστε τις συνθήκες ανάδευσης σύμφωνα με τις οδηγίες.

Βήμα	Φιάλη/πλάκα	Διαδικασία
1. Παρασκευή διαλύματος πλύσης	<b>WASHBUF</b> <b>25X</b>	Αραιώστε 50 mL συμπυκνώματος πλύσης με 1200 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού.
	<b>CONJ</b> <b>Anti-CA15-3</b>	Αναμίξτε 50 µL γνήθεται HRP anti-CA15-3 με 1 mL anti-CA15-3 βιοτίνης ανά βοθρίο:
Παρασκευή διαλύματος αντισώματος	<b>BIOTIN</b> <b>Anti-CA15-3</b>	
	Αρ. βοθρίων	Ιγνηθής, HRP anti-CA15-3 (µL) βιοτίνης (mL)
	1	50 1
	2	100 2
	3	150 3
	4	200 4
	5	250 5
	6	300 6
	7	350 7
	8	400 8
	9	450 9
	10	500 10
11	550 11	
12	600 12	

					12	600	12
2.	Αραιωτικό δείγματος	<b>DIL</b>	<b>SPE</b>	Αναμίξτε 25 µL δείγματος ασθενούς με 1 mL αραιωτικού δείγματος.			
3.	Πλύση	<b>MICROPLA</b>	Πλύντε κάθε βοθρίο μία φορά με διάλυμα πλύσης				
4.	Προσθήκη βαθμονομητών, υλικών ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων	<b>CAL</b>	<b>CA15-3</b>	25 µL σε κάθε βοθρίο			
		0, 15, 50, 125, 250	<b>CONTROL</b>	<b>CA15-3</b>			
		1, 2					
5.	Προσθήκη διαλύματος αντισώματος	<b>ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ</b>					
6.	Επίωση	<b>MICROPLA</b>	100 µL σε κάθε βοθρίο				
7.	Πλύση	<b>MICROPLA</b>	2 ώρες ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου				
8.	Προσθήκη TMB υποστρώματος HRP	<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>	Πλύντε κάθε βοθρίο έξι φορές με διάλυμα πλύσης			
				100 µL σε κάθε βοθρίο			
9.	Επίωση	<b>MICROPLA</b>	30 λεπτά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου				
10.	Μέτρηση απορρόφησης	<b>MICROPLA</b>	620 nm				
Alt.10	Προσθήκη διαλύματος τερµατισμού	<b>STOP</b>	100 µL σε κάθε βοθρίο				
Alt.11	Επίωση	<b>MICROPLA</b>	1 λεπτό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου				
Alt.12	Μέτρηση απορρόφησης	<b>MICROPLA</b>	Μέτρηση σε μήκος κύματος 405 nm εντός 15 λεπτών				

6. Επωάστε το πλαίσιο που περιέχει τα βοθρία για 2 ώρες ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου (20–25°C) με διαρκή ανάδευση της πλάκας χρησιμοποιώντας αναδευτήρα μικροπλάκας.
7. Πλύντε κάθε βοθρίο 6 φορές χρησιμοποιώντας τη διαδικασία πλύσης που περιγράφεται στις σημειώσεις διαδικασίας, σημείο 4.
8. Προσθέστε 100  $\mu$ L TMB υποστρώματος HRP σε κάθε βοθρίο με τη χρήση της ίδιας διαδικασίας χορήγησης με πιπέτα όπως και στο σημείο 5. Το TMB υποστρώματος HRP θα πρέπει να προστεθεί στα βοθρία όσο το δυνατόν πιο γρήγορα και ο χρόνος μεταξύ της προσθήκης του πρώτου και του τελευταίου βοθρίου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 λεπτά.
9. Επωάστε για 30 λεπτά ( $\pm$  5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου με διαρκή ανάδευση. Αποφύγετε το άμεσο ηλιακό φως.
10. Καταγράψτε αμέσως την απορρόφηση σε μήκος κύματος 620 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών.

### Προαιρετικά

Αν το εργαστήριο δεν έχει πρόσβαση σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών που να είναι ικανό για μετρήσεις σε μήκος κύματος 620 nm, η απορρόφηση μπορεί να καθοριστεί ως εξής:

Alt. 10. Προσθέστε 100  $\mu$ L διαλύματος τερματισμού. Αναμείξτε και μετρήστε την απορρόφηση σε μήκος κύματος 405 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών εντός 15 λεπτών από την προσθήκη διαλύματος τερματισμού.

### Περιοχή τιμών μέτρησης

H CanAg CA15-3 EIA μετράει συγκεντρώσεις μεταξύ 1 και 250 U/mL. Αν αναμένονται συγκεντρώσεις CA15-3 πάνω από την περιοχή μέτρησης, συνιστάται η αραιώση των δειγμάτων 1/400 και 1/4000 με αραιωτικό δείγματος πριν την ανάλυση.

### Έλεγχος ποιότητας

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υλικό ελέγχου CA15-3 1 και 2 για την επικύρωση της σειράς δοκιμών. Οι περιοχές των αναμενόμενων αποτελεσμάτων αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Αν ληφθούν τιμές εκτός της καθορισμένης περιοχής, πρέπει να γίνει πλήρης έλεγχος των αντιδραστηρίων και της απόδοσης της συσκευής μέτρησης, και η ανάλυση θα πρέπει να επαναληφθεί. Κάθε εργαστήριο μπορεί επιπρόσθετα να παρασκευάσει τις δικές του ποσότητες ορού σε διαφορετικά επίπεδα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά υλικά ελέγχου για να διασφαλιστεί η ακρίβεια της δοκιμής.

### Υλικό αναφοράς

Καθώς δεν είναι διαθέσιμο κοινό υλικό αναφοράς για το αντιγόνο MUC-1 (CA15-3), οι τιμές βαθμονομητή CanAg CA15-3 EIA αντιστοιχίζονται έναντι ενός συνόλου εσωτερικών προτύπων αναφοράς.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αν χρησιμοποιείται μετρητής φασματοφωτόμετρου μικροπλακών με ενσωματωμένο πρόγραμμα υπολογισμού δεδομένων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο για το μετρητή πλάκας και δημιουργήστε ένα πρόγραμμα με τη χρήση της συγκέντρωσης που αναφέρεται στις ετικέτες για κάθε βαθμονομητή CA15-3.

Για τον αυτόματο υπολογισμό των αποτελεσμάτων CA15-3 συνιστάται να χρησιμοποιήσετε κάποια από τις παρακάτω μεθόδους:

- Μέθοδος τριτοβάθμιας πολυωνυμικής καμπύλης. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην καμπύλη με την τιμή 0 U/mL.
- Μέθοδος ομαλοποιημένης πολυωνυμικής καμπύλης. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό.
- Προεκβολή με εκτίμηση σημείου-σε σημείο. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην καμπύλη με την τιμή 0 U/mL.
- Μέθοδος δευτεροβάθμιας πολυωνυμικής καμπύλης. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην καμπύλη με την τιμή 0 U/mL.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί η παραμετρική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων ή η γραμμική παλινδρόμηση.

Για μη αυτόματη εκτίμηση, δημιουργείται μια καμπύλη βαθμονόμησης με τη γραφική αναπαράσταση των τιμών απορρόφησης (A) που λαμβάνονται για κάθε βαθμονομητή CA15-3 έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης CA15-3 (σε U/mL), δείτε την εικόνα παρακάτω. Οι τιμές για τις άγνωστες συγκεντρώσεις CA15-3 λαμβάνονται από την καμπύλη βαθμονόμησης με τη χρήση της τιμής μέσης απορρόφησης για κάθε δείγμα ασθενούς.

Αν τα δείγματα σε μια αρχική ανάλυση δίνουν επίπεδα CA15-3 υψηλότερα από 250 U/mL, τα αραιωμένα δείγματα (1/41) θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω 1/10 και 1/100 με αραιωτικό δείγματος για λήψη επακριβώς της συγκέντρωσης CA15-3 των δειγμάτων.

1/10 αραιώση = 50  $\mu$ L δείγματος + 450  $\mu$ L αραιωτικού δείγματος

1/100 αραιώση = 50  $\mu$ L αραιώσης 1:10 + 450  $\mu$ L αραιωτικού δείγματος

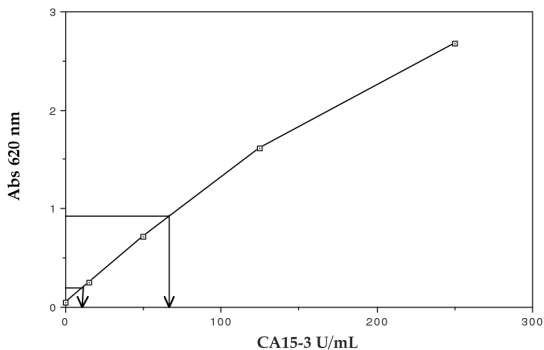
Η συγκέντρωση CA15-3 του μη αραιωμένου δείγματος υπολογίζεται ως εξής:

Αραιώση 1/10: 10 x μετρημένη τιμή

Αραιώση 1/100: 100 x μετρημένη τιμή

## Παράδειγμα αποτελεσμάτων

Δείγμα βαθμονομητή			Τιμές	Μέση τιμή απορρόφησης (A)	CA15-3 (U/mL)
CAL	CA15-3	0	0 U/mL	0,044	
CAL	CA15-3	15	15 U/mL	0,252	
CAL	CA15-3	50	50 U/mL	0,723	
CAL	CA15-3	125	125 U/mL	1,612	
CAL	CA15-3	250	250 U/mL	2,680	
Δείγμα A				0,241	14,1
Δείγμα B				0,895	63,1



Παράδειγμα  
(να μην χρησιμοποιηθεί αυτή η καμπύλη ή ο πίνακας  
παραπάνω για τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων δοκιμής)

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το επίπεδο του CA15-3 δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απόλυτη ένδειξη της παρουσίας ή απουσίας κακοήθους νοσήματος και η εξέταση CA15-3 δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται στον έλεγχο για καρκίνο. Τα αποτελέσματα της εξέτασης θα πρέπει να ερμηνευθούν μόνο σε συνδυασμό με άλλες διερευνήσεις και διαδικασίες για τη διάγνωση της νόσου και τη διαχείριση των ασθενών, και η εξέταση CA15-3 δεν θα πρέπει να αντικαταστήσει την καθιερωμένη κλινική εξέταση.

Τα αντι-αντιδραστικά αντισώματα (ανθρώπινα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών από ποντίκι (HAMA) ή ετεροφιλικά αντισώματα) στο δείγμα ασθενούς μπορεί περιστασιακά να παρέμβουν στη δοκιμή, ακόμα και αν έχουν συμπεριληφθεί συγκεκριμένοι ανασταλτικοί παράγοντες στα ρυθμιστικά διαλύματα.

## ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Το CanAg CA15-3 μετρήθηκε σε 51 υγιείς αιμοδότες. Η μέση τιμή που ελήφθη ήταν 15 U/mL με τυπική απόκλιση 6,8. Η μέση τιμή ήταν 13,8 U/mL, σε περιοχή 6–36 U/mL. Οι άνω και κάτω τιμές της φυσιολογικής περιοχής τιμών εξετάστηκαν με τη χρήση της μη παραμετρικής στατιστικής μεθόδου που προτείνει η IFCC. Το διάστημα αναφοράς περιέχει το κεντρικό κλάσμα 95% της διανομής αναφοράς. Τα όρια αναφοράς μπορεί να εκτιμηθούν αντιστοίχως ως τα 2,5% (κάτω) και 97,5% (άνω) ποσοστιαία σημεία. Αυτά τα όρια αποκλείουν ένα κλάσμα 2,5% των τιμών σε κάθε ουρά της διανομής αναφοράς. Μη παραμετρικές εκτιμήσεις:

N=51

Κλάσμα	Όριο αναφοράς (U/mL)
2,5 <sup>ο</sup> (κάτω)	7
97,5 <sup>ο</sup> (πάνω)	36

Το 94% των υγιών γυναικών είχαν τιμές δοκιμής κάτω από 30 U/mL.

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τη δική του περιοχή φυσιολογικών τιμών για παράγοντες του τοπικού περιβάλλοντος, όπως διατροφή, κλίμα, συνθήκες διαβίωσης, επιλογή ασθενούς κ.λπ. Θα πρέπει επίσης να έχετε υπόψη ότι τα αποτελέσματα γραμμής βάσης του ασθενούς παρέχουν το σημαντικότερο σημείο αναφοράς για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων δείκτη.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### Ακρίβεια

Η συνολική ακρίβεια υπολογίστηκε σύμφωνα με την κατευθυντήρια οδηγία EP5-A (7) του NCCLS με τη χρήση τεσσάρων επιπέδων κατεψυγμένων ποσοτήτων ανθρώπινου ορού που περιέχουν πρόσθετη ανθρώπινη CA15-3. Κάθε δείγμα χορηγήθηκε τυχαιοποιημένα με πιπέτα (n=2/ανάλυση) και αναλύθηκε δύο φορές κάθε ημέρα, για 20 ημέρες. Οι αναλύσεις έγιναν σε περίοδο 40 μηνών από  $\geq$  τρεις διαφορετικούς τεχνικούς και χρησιμοποιήθηκαν 20 διαφορετικοί συνδυασμοί αντιγόνου CanAg CA15-3 EIA.

Δείγμα	Επαναλήψεις	Μέση τιμή (U/mL)	Τυπική απόκλιση SD στον ίδιο αναλυτικό κύκλο (U/mL)	Συντελεστής μεταβλητότητας στον ίδιο αναλυτικό κύκλο CV%	Τυπική απόκλιση SD μεταξύ ημερών (U/mL)	Συντελεστής μεταβλητότητας μεταξύ ημερών CV%
CA15-3 1	80	15,8	0,55	3,5	1,16	7,3
CA15-3 2	80	57,0	1,73	3,0	6,37	11
CA15-3 3	80	78,6	2,93	3,7	5,29	6,7
CA15-3 4	80	148	4,86	3,3	8,37	5,6

### Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης της CanAg CA15-3 EIA είναι  $< 1$  U/mL που ορίζεται ως τη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή απορρόφησης του βαθμονομητή CA15-3 0 συν 2 τυπικές αποκλίσεις σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL } 0}{\text{OD CAL } 15 - \text{OD CAL } 0} \times 15 \text{ U/mL}$$

### Ανάκτηση

Προετοιμάστηκαν εμπλουτισμένα δείγματα ορού με την προσθήκη ανθρώπινου αντιγόνου CA15-3 σε φυσιολογικά δείγματα ορού. Η ανάκτηση του πρόσθετου αντιγόνου ήταν εντός της περιοχής 95-110%.

## Φαινόμενο άγκιστρου

Δεν παρατηρήθηκε φαινόμενο άγκιστρου με δείγματα μέχρι 7500 U/mL. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Σε πολύ υψηλά δείγματα, το χρώμα του υποστρώματος θα αλλάξει από μπλε σε πρασινόχρουν (και τελικά σε κίτρινο για εξαιρετικά υψηλά δείγματα). Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα ψευδώς χαμηλή απορρόφηση σε μήκος κύματος 620 nm, και σε ακραίες περιπτώσεις η απορρόφηση μπορεί να βρίσκεται εντός της καμπύλης βαθμονόμησης και να παρατηρηθεί ως άγκιστρο.

## Γραμμικότητα

Τα δείγματα ασθενούς αραιώθηκαν διαδοχικά με αραιωτικό δείγματος και αναλύθηκαν. Οι τιμές που ελήφθησαν ήταν μεταξύ 93–102% των αναμενόμενων τιμών στην περιοχή 25–250 U/mL.

## Ειδικότητα

Η CanAg CA15-3 EIA βασίζεται σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, το προσελκύν μονοκλωνικό αντίσωμα Ma695 που στοχεύει ένα σιελοποιημένο υδατανθρακικό επίτοπο και το ανιχνεύον μονοκλωνικό αντίσωμα Ma552 που στοχεύει το υδρόφιλο πεπτιδίο PDTRPAPG του πρωτεϊνικού πυρήνα. Ακολουθήθηκε η κατευθυντήρια οδηγία EP7-P (8) του NCCLS για τον προσδιορισμό πιθανών πηγών παρεμβολών. Οι παρακάτω ουσίες και συγκεντρώσεις εξετάστηκαν και βρέθηκαν ότι δεν παρεμβαίνουν στην εξέταση.

	Συγκέντρωση χωρίς σημαντική (± 10%) παρεμβολή
Λιπαιμία (Intralipid®)	10 mg/mL
Χολερυθρίνη, μη συζευγμένη	0,6 mg/mL
Αιμοσφαιρίνη	5 mg/mL

## **ΕΓΓΥΗΣΗ**

Η λήψη των δεδομένων απόδοσης που παρουσιάζονται εδώ έγινε με τη διαδικασία δοκιμής που αναφέρεται. Οποιαδήποτε αλλαγή ή τροποποίηση της διαδικασίας που δεν συνιστάται από την Fujirebio Diagnostics μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Σε αυτή την περίπτωση, η Fujirebio Diagnostics αποποιείται όλων των εγγυήσεων, ρητών, σιωπηρών ή θεσμικών, συμπεριλαμβανομένης σιωπηρής εγγύησης εμπορευσιμότητας και καταλληλότητας για χρήση.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Bon, G., Kenemans, P., Yedema, C.A., vanKamp, G.J., Nijman, H.W., and Hilgers, J. (1990) Clinical relevance of the tumor marker CA15.3 in the management of cancer patients in "From Clone to Clinic" p. 111-122, Crommelin and Schellekens (eds.) Kluwer Academic Publishers
2. Nilsson O., Karlsson B., Lindholm L., Pettersson A. (1994) Development of assays for determination of MUC-1 breast cancer antigen, 7th Symposium on Tumor Markers, Hamburg 1993, R Klapdor (ed) Current Tumor Diagnostics: Applications, Clinical Relevance, Research, Trends. W. Zuckswerd Verlag München, 1994.
3. Baeckström D., Nilsson O., Price MR, Lindholm L., and Hansson GC. (1993) Discrimination of MUC1 mucins from other Sialyl-Le<sup>a</sup>-carrying glycoproteins by colon carcinoma cells using a novel monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 53:755.
4. Blockzijl A, Nilsson K, and Nilsson O. (1998) Epitope characterization of MUC1 antibodies *Tumor Biology* 19 suppl. 1:46-56
5. Price M.R. et al., (1998) Summary Report on the ISOBM TD-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies against the MUC1 Mucin *Tumor Biology* 19 suppl. 1:1-20
6. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: 26-29.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



---

To CanAg® είναι σήμα κατατεθέν της Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
PO Box 121 32  
SE-402 42 Göteborg  
Sweden  
Τηλέφωνο + 46 31 85 70 30  
Φαξ + 46 31 85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com