

# PATHOZYME® BREAST CANCER ANTIGEN 15-3 Ref OD297

## Enzimski imunotest za kvantitativno određivanje CA15-3

### u humanom serumu

Čuvati na temperaturi od 2-8 °C.

NE ZAMRZAVATI. Samo za in vitro upotrebu.

Kancer dojke je najčešća forma kancera kod žena (izuzev kožnih kancera koji nisu melanomi) i najčešći uzročnik smrtnosti usled kancera kod žena u dobi od 40-55 godina. Jedan od ključnih markera ove bolesti je kancer antigen 15-3, dok ostali markeri uključuju i CA549.

CA 15-3 je mucinski glikoprotein velike molekularne mase. Lokalizovan je na apikalnoj strani alveola i duktusa mamarnih žlezda, a prisutan je kao cirkulišući antigen. CA 15-3 je pronađen kod više od 80% svih slučajeva metastatskih karcinoma dojke. CA 15-3 može biti povećan i kod benignih stanja, naročito ako su hepatičnog porekla. Ipak, ove povišene vrednosti retko su više od 100 U/ml. Povišene vrednosti CA 15-3 su pronađene kod samo 5% zdravih osoba.

Nema korelacije između serumskih nivoa CA 15-3, stadijuma bolesti i prognoze. Ipak, veoma visoke vrednosti CA 15-3 (5-10 puta u odnosu na normalne) imaju tendenciju da ukazuju na uznapredovalu bolest i mogućnost prisustva metastaza. Istraživanja sugerišu da postoji dobra generalna korelacija između promene nivoa CA 15-3 i odgovora na terapiju metastatskih kancera, ali se ova dva parametra ne mogu povezati bez postojanja potvrđenih kliničkih podataka.

Nivoi CA15-3 se takođe povećavaju kod tumora kolona, pluća i jetre.

#### NAMENA TESTA

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** je enzimski imunotest za kvantitativno određivanje karcinom antigena dojke 15-3 u humanom serumu. Samo za profesionalnu upotrebu.

#### PRINCIP TESTA

CA 15-3 ELISA test zasniva se na principu antitela u čvrstoj fazi. Sistem se zasniva na upotrebi monoklonskih tela na određene antigene determinante (na mikrotitracionoj ploči). Konjugat zečija anti-CA 15-3 antitela-peroksidaza (HRP) nalazi se u rastvoru konjugata. Testirani uzorak reaguje sekvencijalno sa dva antitela, dajući molekule CA 15-3 u sendviču između čvrste faze i antitela vezanih za enzim. Nakon dve odvojene inkubacije čašice se ispiraju destilovanom vodom da bi se uklonila nevezana obeležna antitela. Dodaje se rastvor TMB-a, a boja se razvija samo u onim čašicama u kojima je prisutan enzim, indikujući prisustvo CA 15-3. Razvijanje boje se zaustavlja dodatkom rastvora za zaustavljanje reakcije uz promenu boje u žutu. Koncentracija CA 15-3 je direktno proporcionalna intenzitetu promene boje testiranog uzorka. Apsorbancija se meri spektrofotometrijski na 450nm. Test je kalibrisan u odnosu na interni standard. Interacionalni standard za ovaj test ne postoji.

#### SADRŽAJ

Ref  
OD297



Microtitre Plate		12 x 8 wells x 1		
Čašice obložene specifičnim antitelom, u specijalnoj kesici koja se može više puta zatvoriti, sa desikantom.				
Cal	A	0 U/ml	2 ml	
Referentni standard: humani serum bez CA 15-3. Spreman za upotrebu. (Bezbojan).				
Cal	B	15 U/ml	2 ml	
Referentni standard: CA 15-3 u humanom serumu. Spreman za upotrebu. (Bezbojan).				
Cal	C	30 U/ml	2 ml	
Referentni standard: CA 15-3 u humanom serumu. Spreman za upotrebu. (Bezbojan).				
Cal	D	60 U/ml	2 ml	
Referentni standard: CA 15-3 u humanom serumu. Spreman za upotrebu. (Bezbojan).				
Cal	E	120 U/ml	2 ml	
Referentni standard: CA 15-3 u humanom serumu. Spreman za upotrebu. (Bezbojan).				
Cal	F	240 U/ml	2 ml	
Referentni standard: CA 15-3 u humanom serumu. Spreman za upotrebu. (Bezbojan).				
Conj	22X		1 ml	
Koncentrovani anti-CA 15-3 HRP konjugat: anti-kancer antigen 15-3 konjugovan HRP-om. (Bezbojan).				
DIL	SPEC		2 X 50ml	
Rozcieńczalnik próbek: bufor fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Roztwór roboczy. (Žółty)				
DIL	Conj		21 ml	
Diluent za uzorak: pufer na bazi fosfata koji sadrži stabilizujuće proteine. Spreman za upotrebu. (Žut).				
Subs	TMB		11 ml	
Rastvor supstrata: 3,3',5,5'-tetrametil benzidin u citratnom puferu. (Bezbojan).				
Solin	Stop	HCl	1M	11 ml
Rastvor za zaustavljanje reakcije: HCl razblažena prečišćenom vodom. Sprema za upotrebu. (Bezbojan).				
Uputstvo za upotrebu i obrazac za upisivanje podataka				1 + 1

#### PRIBOR I UREĐAJI KOJI SU POTREBNI, ALI SE NE NALAZI U OKVIRU KOMPLETA

mikropipete za prenošenje: 100 µl, 200 µl i 1000 µl  
nastavci za pipete za jednokratnu upotrebu  
vorteks mešalica  
termostat na 37 °C +/- 1 °C  
psorbujući papir  
čitač mikrotitrarskih ploča podešen na 450nm  
logaritamski papir  
čisto laboratorijsko posude.

#### OPREZ

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** reagensi sadrže materijal humanog porekla, za koji je nakon testiranja utvrđeno da je negativan na HCV, HIV I i HIV II antitela i HbsAg, FDA odobrenim metodama. Kako nijedan test ne pruža potpunu sigurnost da materijal

humanog porekla nije infektivan, preporučljiv je oprez prilikom rukovanja reagensima iz kompleta (upotrebe i bacanja). Sve reagense treba smatrati biohazardnim materijalom. Ne gutati.

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** reagensi ne sadrže opasne supstance definisane važećim propisima UK Chemicals (Obaveštenja i način pakovanja opasnih materija), ali se ipak moraju smatrati biohazardnim materijalom. Bacanje upotrebljenog materijala mora biti u skladu sa lokalnim zakonom.

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** za zaustavljanje reakcije sadrži HCl, te je korozivan. Rukovati sa oprezom. U slučaju kontakta, dobro isprati vodom.

**PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** reagensi sadrže 1% Proclin™ 300 kao konzervans koji može biti toksičan ako se unese per os. U slučaju kontakta, dobro isprati vodom i potražiti medicinsku pomoć.

Proclin™ 300 je zaštićeni proizvod ROHM&HAAS Ltd.

#### ČUVANJE

Čuvati na temperaturi od 2-8 °C.

Datum isteka roka je poslednji dan meseca koji je označen na bočici i ambalaži kompleta. Reagensi unutar kompleta ponašaću se odgovarajuće do isteka roka trajanja, koji je određen u odnosu na datum proizvodnje. Ne koristiti nakon isteka roka trajanja.

Izbegavati izlaganje reagensa temperaturama izvan ovog opsega. Ne izlagati direktno sunčevoj svetlosti.

NE ZAMRZAVATI NIJEDAN REAGENS, jer može doći do ireverzibilnih promena.

#### UZIMANJE UZORKA

Uzeti uzorak venske krvi i ostaviti da dođe do koagulacije i retrakcije. Centrifugirati koagulisanu krv, radi dobijanja čistog seruma. Preporučljivo je koristiti sveže uzorke seruma.

Ne koristiti hemolizovane, kontaminirane ili lipemične serume, jer ove pojave mogu uticati na rezultate testiranja.

Serum se može čuvati na temperaturi od 2-8 °C do 48 h pre testiranja. Ako je potrebno produžiti vreme čuvanja, čuvati na -20 °C do 1 godine. Otopljeni uzorci moraju se pre ispitivanja promešati.

Ne koristiti natrijum azid kao konzervans, jer može inhibirati peroksidazu.

Jednom otopljeni uzorak ne zamrzavati i otapati ponovo, jer može doći do pojave netačnih rezultata.

#### PRIPREMA REAGENSA

Pre upotrebe svi reagensi moraju dostići sobnu temperaturu (20 °C - 25 °C) i moraju se pažljivo promućkati. Ne stvarati penu.

Za pripremu radnog rastvora anti-kancer antigena 15-3 HRP konjugata, dodati jedan deo koncentrata konjugata u 21 deo diluenta za konjugat (razblaženje 1:22); 200µl je preporučljiva zapremina po čašici. Razblaženi reagens je stabilan 4 meseca na temperaturi 2-8 °C.

#### OGRANIČENJA

Upotreba drugih uzoraka osim seruma, nije validna.

Proizvod je samo za jednokratnu upotrebu.

Dijagnoza ne sme biti zasnovana samo na nalazu jednog testiranja. Prilikom interpretacije testa, preporučljivo je uzeti u obzir sve kliničke nalaze.

#### POSTUPAK ISPITIVANJA

- Pre upotrebe svi reagensi moraju dostići sobnu temperaturu (20 °C - 25 °C).
- Sa svakom serijom seruma koji se ispituju, upotrebiti set standarda. U držač postaviti potreban broj čašica. Na priložen obrazac za upisivanje podataka obeležiti pozicije standarda i ispitivanog seruma.
- Nepotrebne čašice vratiti u kesicu sa desikantom i zatvoriti zip-lock pre vraćanja na temperaturu od 2-8 °C.
- Serum se pre ispitivanja mora razblažiti. 20µl seruma razblažiti sa 1000µl diluenta za uzorke. CA 15-3 standardi su razblaženi i spremni za upotrebu.

5. Preneti 200 $\mu$ l standarda i razblaženog seruma u obeležene čašice i mučkati 10 sekundi.
6. Inkubirati 60 minuta na 37 °C
7. Na kraju inkubacionog perioda, odbaciti sadržaj čašica, brzim i oštrim lupkanjem čašica o kontejner za odbacivanje biohazardnog materijala. Snažno lupnuti na apsorbujući papir. U kontejneru za odbacivanje biohazardnog materijala mora biti dovoljna količina sredstva za dezinfekciju.
8. Ručno ispiranje: ispuniti čašice sa po najmanje 300 $\mu$ l destilovane vode po čašici. Odbaciti sadržaj čašica brzim i oštrim lupkanjem čašica o kontejner za odbacivanje biohazardnog materijala. Snažno lupnuti na apsorbujući papir. Da bi se uklonile zaostale kapi vode, lupnuti čašice na apsorbujući papir.
9. Mašinsko ispiranje: u svaku čašicu mora se preneti 300 $\mu$ l destilovane vode, a u bocu za odbacivanje dodati odgovarajuću količinu dezinficijensa. Prazne čašice isprati 5 puta. Posle ispiranja ukloniti zaostalu tečnost lupkanjem čašica na apsorbujući papir.
11. Preneti 200 $\mu$ l 1:22 anti-CA 15-3 HRP konjugata u svaku čašicu i mučkati 10 sekundi.
12. Inkubirati 60 minuta na 37 °C.
13. Isprati po gore opisanom postupku.
14. Preneti 100 $\mu$ l rastvora supstrata u svaku čašicu i nežno mučkati 10 sekundi.
15. Inkubirati na tamnom mestu 20 minuta na sobnoj temperaturi (20-25 °C).
16. Zaustaviti reakciju dodatkom 100 $\mu$ l rastvora za zaustavljanje reakcije.
17. Nežno mučkati 30 sekundi dok plava boja potpuno pređe u žutu.
18. Odmah očitati optičku gustinu (ne nakon 10 minuta) na 450nm.

#### PROBLEMI U RADU

Testiranje može obaviti samo obučeno osoblje.

Ne koristiti oštećene ili kontaminirane komponente kompleta.

Da bi se izbegla unakrsna kontaminacija za svaki uzorak koristiti poseban nastavak za jednokratnu upotrebu.

Preporučljivo je dvostruko ispitivanje uzoraka i standarda.

Uzorke i standarde ispitati u isto vreme, kako bi uslovi testiranja bili isti. Ako se pipetira manuelno, nije preporučljivo koristiti više od 32 čašice tokom ispitivanja, jer pipetiranje standarda i uzoraka mora biti obavljeno u roku od 3 minuta. Cela ploča od 96 čašica može se koristiti ako se pipetiranje vrši automatski.

Odmah nakon završetka testiranja, zatvoriti sve bočice.

Izbegavati ponavljano pipetiranje radnih rastvora, jer može doći do njihove kontaminacije.

Ne mešati reagense ili čašice iz različitih kompleta. Prilikom prenošenja, ne dodirivati ivice čašica.

Reagens ne sme cureti duž ivica čašica. Pre početka, svi reagensi moraju dostići sobnu temperaturu (20 °C to 25 °C). Nežno promućkati sve reagense blagim obrtanjem naopačke ili mučkanjem.

Tokom ispitivanja čašice ne smeju postati suve.

Rastvor supstrata ne sme se kontaminirati, jer ova pojava čini komplet neaktivnim.

Kako bi se obezbedilo dobijanje pouzdanih rezultata, preporučljivo je proveravati preciznost i tačnost laboratorijske opreme koja se koristi tokom ispitivanja.

Čašice koje nisu potrebne za ispitivanje, vratiti u foliju sa desikantom, zatvoriti zip-lock i vratiti na temperaturu od 2-8 °C.

#### IZRAČUNAVANJE REZULTATA

Za svaki set standarda i uzoraka izračunati srednju vrednost apsorbanije na 450nm. Konstruisati standardnu krivu spajanjem srednje vrednosti apsorbanije svakog standarda i pripadajuće koncentracije izražene u U/ml. Preko srednje vrednosti apsorbanije za svaki uzorak, sa standardne krive odrediti vrednost koncentracije CA 15-3 u U/ml. Ako kontrole ili uzorci sa poznatim vrednostima ne daju očekivane rezultate, rezultate ispitivanja smatrati nevažnim. Ako se koristi softverski program, odabrati opciju "Quadratic regression curve fit".

#### OČEKIVANI REZULTATI I OSETLJIVOST

Kriva koja se dobija merenjem optičke gustine kalibratora na 450nm i spajanjem dobijenih vrednosti sa vrednostima njihovih koncentracija mora biti hiperbola. Optička gustina kalibratora A mora biti

manja od 0,5, a kalibratora F mora biti veća od 1,1, da bi se dobijeni rezultati smatrali važećim.

Kod zdravih žena očekivane vrednosti CA 15-3 manje su od 35 U/ml. Najmanja koncentracija koja se može detektovati testom **PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3** je 5 U/ml.

#### EVALUACIJA

Kalibracija je izvršena u odnosu na značajne konkurentske kuće i interni standard. Koeficijent varijacije PATHOZYME BREAST CANCER ANTIGEN 15-3 je manji ili jednak 10%. Tokom evaluacije Omega Pathozyme CA 15-3 testa i Abbot AxSym Kit-a, za uzorke sa vrednostima koji se nalaze u opsegu 8.0 – 2000 U/ml, dobijeni su sledeći rezultati:

Broj uzoraka	63
Koeficijent korelacije	0.97
Slope	0.93
Intercept	10.2
Srednja vrednost dobijena testiranjem sa Omega testom	209.9 U/ml
Srednja vrednost dobijena testiranjem sa Abbott testom	197 U/ml

Oba testa daju dobru korelaciju.

#### REFERENCE

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. *Ann. 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. **Ueronesi S, Gambocorta M.** Detection of Ki-67 rate in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1991;95:30-4.
12. **Lotnickier M, Pavesi F, Scarabelli M.** Tumour associated antigens CA-15-3 and CA-125 in ovarian cancer. *Int. J. Biolog. Markers* 1991;6:115.

#### BRZI POSTUPAK ISPITIVANJA

1. Preneti 200 $\mu$ l razblaženog uzorka ili standarda u svaku čašicu i nežno mučkati 10 sekundi.
2. Inkubirati 60 minuta na 37 °C.
3. Odbaciti sadržaj čašica i isprati 5 puta destilovanom vodom.
4. Dodati 200 $\mu$ l 1:22 anti-CA 15-3 HRP konjugata u svaku čašicu. Nežno mučkati 10 sekundi.
5. Inkubirati 60 minuta na 37 °C.
6. Odbaciti sadržaj čašica i isprati 5 puta destilovanom vodom.
7. Preneti 100 $\mu$ l supstrata. Nežno mučkati 10 sekundi.
8. Inkubirati na tamnom mestu 20 minuta na sobnoj temperaturi (20 °C to 25 °C).
9. Dodati 100 $\mu$ l rastvora za zaustavljanje reakcije i nežno mučkati 30 sekundi.
10. Odmah očitati optičku gustinu (ne nakon isteka 10 minuta) na 450nm.

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



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