

**CA 15-3****ИН ВИТРО ЕНЗИМЕН ИМУНОЛОГИЧЕН ТЕСТ ЗА КОЛИЧЕСТВЕННО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА АНТИГЕН СА 15-3 В СЕРУМ.****ВЪВЕДЕНИЕ**

Ракът на гърдата е най-често срещаното застрашаващо живота злокачествено заболяване у жените в повечето развити страни. Приблизително 180 000 нови случая се диагностициран всяка година. Грубо у половината от тези ново диагностицирани пациенти няма разсейки, но 30% от тези случаи прогресират до метастазно заболяване. Има голям брой туморни маркери, които помагат на лекарите да идентифицират и диагностицират кои пациентки с рак на гърдата ще развият агресивно болестта и при кои заболяването ще се развива бавно. Тези маркери включват рецепторите на естроген и прогестерон, ДНК –структурата и профила на процента на S фазата, рецептора на фактора на епидермалния растеж, онкогенът HER-2/neu, генът p53 подтискащ туморите, катепсин D, маркерите за възпроизводимост и CA15-3. CA 15-3 е най-полезен за проследяване на пациентите в постоперативния период за повторна поява или рецидив, особено при метастазни заболявания. 96% от пациентите с единична или системна повторна поява имат повишени нива на CA15-3, които могат да се използват за да се предвиди повторната поява преди радиологичните или клинични критерии. Повишение с 25% в серумното ниво на CA15-3 се свързва с прогресивно развитие на карцинома. Намаление с 50% в серумното ниво на CA15-3 се свързва с положителен ефект от лечението. CA15-3 е по-чувствителен от CEA за ранното откриване на рецидивиращ рак на гърдата. В комбинация с CA125 CA15-3 е полезен за ранното откриване на рецидив на рак на яйчниците. Нивата на CA15-3 се повишават и при тумори на дебелото черво, белите дробове и черния дроб.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Концентрацията на СА 15-3 е право пропорционална на наситеността на получения при реакцията цвят на пробата. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично при 450 nm.

РЕАГЕНТИ

1. Anti-CA 15-3 coated microtiter plate, 96 wells
2. CA 15-3 Reference Standards: 0, 15, 30, 60, 120 and 240 U/ml течни, готови за употреба
Тези стандарти са разредени 51 пъти. Не ги разреждайте допълнително.
3. CA 15-3 Enzyme Conjugate Concentrate (22x), 1.0 ml
4. CA 15-3 Enzyme Conjugate Diluent, 21 ml
5. CA 15-3 Sample Diluent, 100 ml
6. Wash Buffer Concentrate (20X), 50ml
7. TMB Reagent, готов, 11 ml
8. Stop Solution (1N HCl), 11 ml.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА ТЕСТА

Неотворените тестове трябва да се съхраняват при 2-8°C в затворената си опаковка с торбички поглъщащи влагата, за да се сведе до минимум излагането на влажен въздух. Отворените тестове остават стабилни до изтичане на срока на годност, ако се съхраняват както е описано по-горе. Тестовите могат да се използват на апарат с ширина на честотната лента 10 nm или по-малка, оптична плътност 0-2 OD или повече при 450 nm дължина на вълната.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Внимание: Този тест съдържа човешки материал. Източникът на този материал е тестван отрицателен за HbsAg, HIV1/2 и HCV, но никой наличен метод не може да гарантира напълно отсъствието им. Следователно третирайте всички кръвни продукти и проби като потенциално заразни. Спазвайте националните разпоредби за работа с биологично опасни материали.
2. Не използвайте реактивите след изтичане на срока на годност и не смесвайте компоненти от кутии с различен партиден номер.
3. Веднага поставйте капачките и не разменяйте капачките на различни шишенца.
4. Не пипетирайте с уста.
5. Избягвайте контакт с 1N HCl – може да причини дразнене или изгаряне на кожата. В случай на контакт измийте обилно с вода и потърсете лекарска помощ, ако дразненето продължи.
6. Само за ин витро диагностична употреба.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Трябва да се използва серум, приготвен от пълна кръв, посредством стандартните лабораторни процедури. Отделете серума до 60 минути от вземането на пробата. Тестът може да се използва само със серум, в който няма добавки. Не използвайте силно хемолизирани, липемични или мътни проби. Пробите могат да се съхраняват при 2-8°C до 24 часа. За по-дълги периоди на съхранение трябва да се замразят до -20°C. Пробите, които са били замразени или са мътни трябва да се центрофугират преди да се тестват. Не съхранявайте замразените проби във FROST FREE фризери, в които може да се получи инцидентно размразяване.

БЕЛЕЖКИ ПО ПРОЦЕДУРАТА

1. Пипетиране: Пипетирането на всички стандарти, проби и контроли трябва да се извърши в рамките на 3 минути.
2. Всички стандарти, проби и контроли, които се пускат в дублиращо измерване трябва да се пускат едновременно, за да са поставени при еднакви условия.
3. Препоръчва се всички ямки да бъдат отчетени до 15 минути след досбавянето на Stop Solution.

ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТИТЕ

1. Всички реагенти трябва да се поставят при стайна температура (18-25 °C) преди употреба.
2. Завъртете леко шишенцата за да се размесят. Не предизвиквайте разпенване.

3. За да пригответе работния CA 15-3 Enzyme Conjugate Reagent смесете 1.0 ml Enzyme Conjugate Concentrate с 21 ml Enzyme Conjugate Diluent и разбъркайте добре (разредяне 1:21). Разреденият Enzyme Conjugate Reagent е стабилен при 4°C поне 4 месеца.
4. Смесете 50 ml от Wash Buffer Concentrate (20x) и 950 ml дестилирана вода, за да получите 1000 ml Wash Buffer (1x). Този миеш буфер е стабилен 1 месец при 2-8°C. Преди употреба разклатете добре. Ако са се образували кристали, те трябва да се разтворят на стайна температура преди да се направи разреждането.

ПРОЦЕДУРА

1. Пробите на пациентите трябва да се разредят 1:51 преди да бъдат изследвани. Пригответе серия малки епруветки (например 1.5 ml) и смесете 20 µl серум с 1.0 ml Sample Diluent. НЕ РАЗРЕЖДАЙТЕ СТАНДАРТИТЕ.
2. Поставете желания брой ямки в носача.
3. Пипетирайте 200 µl от стандартите, разредените проби и разредените контроли в съответните ямки. Разбъркайте леко 10 секунди.
4. Инкубирайте при 37 °C 60 минути.
5. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с ямките в контейнер за отпадъци.
6. Измийте ямките с Wash Buffer (1x) 5 пъти, като преди всеки следващ път изпразвате ямките.
7. Изтупайте рязко ямките върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки.
8. Пипетирайте 200 µl от Enzyme Conjugate Reagent във всяка ямка. Размесете леко в продължение на 10 секунди.
9. Инкубирайте при 37 °C 60 минути.
10. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с ямките в контейнер за отпадъци. Измийте ямките с Wash Buffer (1x) 5 пъти, като преди всеки следващ път изпразвате ямките. Изтупайте рязко ямките върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки.
11. Пипетирайте 100 µl от TMB реагента във всяка ямка. Леко разбъркайте 10 секунди.
12. Инкубирайте при стайна температура на тъмно 20 минути.
13. Спрете реакцията като добавите 100 µl Stop Solution във всяка ямка.
14. Леко разбъркайте 30 секунди. *Много е важно синият цвят напълно да се превърне в жълт.*
15. Отчетете абсорбцията при 450 nm с ELISA апарат до 15 минути.

ИЗЧИСЛЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средната абсорбция (A_{450}) за всеки комплект стандарти, контроли и проби на пациенти.
2. Конструирайте стандартна крива въз основа на абсорбцията на всеки референтен стандарт.
3. Използвайте средната стойност на абсорбцията за всяка проба, за да определите съответната концентрация на СА 15-3 в U/ml от стандартната крива.
4. Резултатите за разредените проби трябва да се коригират с фактора на разреждане.

ПРИМЕР ЗА СТАНДАРТНА КРИВА

Дадената като пример стандартна крива може да служи само като илюстрация и не трябва да се използва при изчисление на неизвестни проби. Всяка лаборатория трябва да получи свои собствени данни и стандартна крива.

CA 15-3 (U/ml)	Абсорбция (450nm)
0	0.053
15	0.274
30	0.442
60	0.818
120	1.606
240	2.746

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ НА ТЕСТА

Здрави жени < 35 U/ml Минималната концентрация на СА 15-3, която този тест може да открие, е 3.75 U/ml. Всяка лаборатория трябва да установи свой собствен диапазон от очаквани стойности.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕСТА

1. Надеждни и възпроизводими резултати ще се получат ако описаната процедура е напълно разбрана и правилно изпълнена.
2. Резултатите от теста трябва да се използват само като една съставна част от диагностичната процедура, при която лекарят трябва да вземе пред вид цялата налична информация.
3. Серумни проби, които са силно липемични, силно хемолизирани или мътни не трябва да се тестват с тази процедура.
4. Процедурата с миенето е от критично значение. Недостатъчно доброто измиване ще повлияе на точността и ще доведе до фалшиво високи стойности на абсорбцията.
5. Не може да се гарантира пълно елиминиране на интерферирането с HAMA в пробите.

Re:102414

Производител: BioCheck Inc., 323 Vintage Park Drive, Foster City, CA94404, USA
Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1