



- Надевать одноразовые латексные перчатки при контакте с реагентами. Микробная контаминация может дать ложные результаты.
- Не использовать реагенты с истекшим сроком годности.
- Не смешивать реагенты между собой и не использовать реагенты из других наборов.

## Набор ИФА

### для определения онкомаркера CA 15-3

Каталог. № : EIA-5068

Количество : 96

Производитель: DRG (Германия)

Методика от 04-2011

Версия 2.0

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

#### 1. ВВЕДЕНИЕ

##### 1.1 Предназначение

Набор DRG TM-CA 15-3 ELISA предназначен для количественного определения в диагностике *in vitro* CA 15-3 в сыворотке и плазме человека.

##### 1.1 Краткое описание и объяснение

Рак груди – самое часто встречающееся злокачественное новообразование у женщин. До 70% пациентов с метастазами чувствительны к системному лечению цитотоксическими лекарствами или эндокринной терапией; поэтому необходимо проводить диагностику этого заболевания на самых ранних стадиях ее развития. Особенно актуально выявление рецидивов болезни у пролечившихся пациентов с раком груди, тестирование которых обычными методами не представляется достаточно надежным. Как показывают исследования, иммунохимическая диагностика ракового антигена CA 15-3 в сыворотке или плазме крови позволяет проводить раннюю диагностику рака груди у женщин.

В тестировании CA 15-3 используют два типа моноклональных антитела (115D8 и DF3), которые реагируют с антигенными детерминантами этого высокомолекулярного гликопротеина. Его эпитопы могут быть с высокой степенью вероятности обнаружены при опухолях поджелудочной железы и желчного пузыря с каналами, раке легких, желудочно-кишечного тракта, а также при других новообразованиях.

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG TM-CA 15-3 ELISA Kit представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на сэндвич-принципе.

Микротитровальные лунки покрыты моноклональными [мышинными] антителами, направленными на специальную антигенную зону молекулы CA15-3.

Аликвот образца пациента, содержащий эндогенный CA15-3, инкубируется в лунке, покрытой ферментным конъюгатом, который является анти-CA15-3 антителом, конъюгированным пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат вымывается. Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации CA15-3 в образце.

При добавлении раствора субстрата, интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна концентрации CA15-3 в образце пациента.

#### 3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты протестированы на ВИЧ и гепатит В и признаны безопасными. Однако весь материал стоит расценивать как потенциально заразный.
- Избегать контакта со стоп-раствором (0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Можно получить раздражение кожи или ожог.
- Не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей или слизистыми.
- Не курить, не есть, не пить, не наносить косметику вблизи реагентов.

#### 4. РЕАГЕНТЫ

1. **Микротитровальный планшет** с 96 лунками, покрытыми анти-CA15-3 моноклональными антителами.
2. **Нулевой стандарт**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию. Содержит нертутный консервант.
3. **Стандарт (1-4)**, 4 флакона, 0,5 мл каждый, готовы к использованию. Концентрации: 25, 50, 100, 200 Е/мл, Содержит нертутный консервант.
4. **Контроль низкий и высокий**, 2 флакона по 0,5 мл в лиофилизированном виде, см. «Подготовка реагентов». Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетке флакона или в листе контроля качества.
5. **Буфер анализа**, 1 флакон, 30 мл, готов к использованию. Содержит нертутный консервант.
6. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Анти-CA15-3 антитело, конъюгированное пероксидазой хрена. Содержит нертутный консервант.
7. **Субстратный раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Содержит 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
9. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл (40× концентрированный). См. «Подготовка реагентов».

**Внимание:** Дополнительный *Нулевой Стандарт* для разбавления образцов доступен по запросу.

#### 4.2 Требуемые материалы, не поставляемые в наборе

- Микропланшетный ридер (450 ± 10 нм)
- Калиброванные микропипетки переменной точности.
- Гигроскопичная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Таймер
- Полулогарифмическая миллиметровка или программное обеспечение для сжатия данных

#### 4.3 Условия Хранения

При условии хранения 2 – 8 °С не вскрытые реагенты сохраняют реактивность до истечения срока годности. Не используйте реагенты после этой даты.

Открытые реагенты должны храниться при 2 – 8 °С. Микролунки должны храниться 2 – 8 °С. Как только мешок фольги был открыт, необходимо снова его прочно закрыть. Открытые наборы сохраняют активность в течение двух месяцев при условиях, описанных выше.

#### 4.4 Подготовка реагентов

Перед использованием доведите все реагенты и требуемое количество стрипов до комнатной температуры.

##### Контроль

Восстановите лиофилизированное содержимое 0,5 мл дистиллированной воды и дайте постоять в течение 10 минут минимум. Смешайте контроль несколько раз перед использованием.

**Внимание:** Ресуспендированные контроли стабильны 2 дня при 2 – 8 °С. При более длительном хранении ресуспендированные контроли должны быть распределены порционно и хранятся при –20 °С.

##### Промывочный раствор

Добавьте деионизированную воду к 40× концентрату промывочного раствора.

Разбавьте 30 мл концентрированного *Промывочного раствора* дистиллированной водой на 1170 мл до заключительного объема 1200 мл.

*Разбавленный Промывочный раствор стабилен в течение 2 недель при комнатной температуре.*

#### 4.5 Утилизация Набора

Утилизация набора должна быть проведена согласно национальным инструкциям. Специальная информация для этого продукта дана в Сертификате Безопасности.

#### 4.6 Поврежденные Наборы

В случае любого тяжелого повреждения набора или компонентов, нужно сообщить об этом в ДРГ в письменной форме не позднее, чем спустя одну неделю после получения набора. Сильно поврежденные компоненты не должны использоваться в тесте. Они должны быть сохранены, пока не будет найдено окончательное решение. После этого они должны быть утилизированы согласно официальным инструкциям.

#### 5 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном анализе могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТА- или гепарин-плазма).

Не используйте гемолизные, желтушные или жирные образцы.

Пожалуйста, обратите внимание: Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться в данном тесте.

#### 5.2 Сбор образцов

##### Сыворотка:

Соберите кровь венипункцией (например, Сарштедт Моноветт # 02.1388.001), позвольте ей сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания. Образцы пациентов, получающих терапию противосвертывающего средства, могут потребовать большего времени свертывания крови.

##### Плазма:

Целая кровь должна быть собрана в пробирки для центрифуги, содержащие антикоагулянт, и центрифугироваться немедленно после отбора.

(Например, для ЭДТА-плазмы Сарштедт Моноветт – красный колпачок - # 02.166.001;

для Гепарина-плазмы Сарштедт Моноветт – оранжевый колпачок - # 02.165.001;

#### 5.3 Хранение и подготовка образцов

Образцы должны быть закрыты и могут храниться до анализа в течение 5 дней при 2 – 8 °С.

Если ЭДТА-плазма хранится при 2 – 8 °С, она должна быть протестирована в течение 48 часов.

Образцы, не востребованные в течение более длительного времени (до двух месяцев), должны быть заморожены только один раз при -20 °С до теста. Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз до тестирования.

#### 5.4 Разбавление Образцов

Если при первом тесте образец содержит аналита больше, чем самый высокий стандарт, его можно разбавить *Нулевым Стандартом* и повторно проанализировать, как описано в Процедура Теста.

Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

##### Пример:

а) разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (смешиваются полностью),

б) разбавление 1:100: 10 мкл разбавления а) 1:10 + 90 мкл *Нулевого Стандарта* (смешиваются полностью).

### 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### 6.1 Общие Замечания

- Всем реактивам и анализам нужно позволить дойти до комнатной температуры перед использованием. Все реагенты должны быть смешаны без вспенивания.
- Как только тест был начат, все шаги должны быть закончены без прерывания.
- Используйте новые одноразовые наконечники пипеток для каждого стандарта, контроля или образца, чтобы избежать контаминации.
- Абсорбция - функция времени инкубации и температуры. Прежде, чем начать тест, рекомендуется, чтобы все реагенты были готовы, удаленные колпачки, все необходимые лунки закреплены в держателе, и т.д. Это обеспечит равное затраченное время для каждого шага раскапывания без прерывания.
- Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

#### 6.2. Процедура анализа

– Каждая постановка должна включать в себя стандартную кривую.

1. Обеспечьте желательное количество лунок в держателе.

2. Распределите 10 мкл каждого Стандарта, Контроля и Образцов **одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки.
3. Распределите 250 мкл Буфера Анализа в каждую лунку. Тщательно перемешайте 10 сек. На этом этапе важно добиться полного смешивания.
4. Инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре.
5. Резко встряхните содержание лунок. Промойте лунки 4 раза разбавленным Раствором Промывки (400 мкл/лунку). Резко выстучите лунки на гигроскопичной бумаге, чтобы удалить остаточные капли.  
**Важное примечание:** Чувствительность и точность данного теста сильно зависит от правильной процедуры промывки!
6. Распределите 100 мкл Ферментного конъюгата в каждую лунку.
7. Инкубируйте в течение 60 минут при комнатной температуре.
8. Резко встряхните содержание лунок. Промойте лунки 4 раза разбавленным Раствором Промывки (400 мкл/лунка). Резко выстучите лунки на гигроскопичной бумаге, чтобы удалить остаточные капли.
9. Добавьте 100 мкл Раствора Субстрата в каждую лунку.
10. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.
11. Остановите ферментативную реакцию, добавляя 100 мкл Стоп-раствора в каждую лунку.
12. Определите абсорбцию (ОП) каждой лунки при  $450 \pm 10$  нм микропланшетным ридером. Рекомендуется, чтобы лунки были считаны в течение 10 минут после добавления Стоп-раствора.

#### 6.3. Вычисление результатов

1. Вычислите средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.
2. Используя полулогарифмическую миллиметровку, создайте стандартную кривую, изображая среднюю абсорбцию, полученную из каждого стандарта против его концентрации со значением абсорбции на вертикальной (Y) оси и концентрации на горизонтали (X) оси.
3. Используя среднее значение абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию от стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты, показанные в данной инструкции, были вычислены автоматически с использованием 4 ПЛ (4-хПараметровой Логистики) кривой. 4-хПараметровая Логистика является предпочтительным методом. Другие функции обработки данных могут дать немного различные результаты.
5. Концентрация образцов может читаться непосредственно по этой стандартной кривой. Образцы с концентрациями выше, чем у самого высокого стандарта, должны быть разбавлены и проанализированы заново либо представлены как > 200 Е/мл. Для вычисления концентраций должен быть принят во внимание фактор разбавления.

#### 6.3.1 Пример типичной калибровочной кривой

Следующие данные предназначены только для демонстрации и **не могут** использоваться для реального анализа.

| Стандарт                 | Оптические единицы (450 нм) |
|--------------------------|-----------------------------|
| Стандарт 0 (0 Е/мл)      | 0,02                        |
| Стандартный 1 (25 Е/мл)  | 0,45                        |
| Стандартные 2 (50 Е/мл)  | 0,82                        |
| Стандартные 3 (100 Е/мл) | 1,43                        |
| Стандартные 4 (200 Е/мл) | 2,03                        |

### 7. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определила свои собственные нормальные и патологические значения.

| Население                  | Среднее (Е/мл) | Медиана (Е/мл) | 5% процентиль (Е/мл) | 95% процентиль (Е/мл) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------------|-----------------------|
| Здоровые мужчины и женщины | 17,28          | 16,80          | 10,12                | 24,42                 |

Результаты соответствуют официальным значениям (< 37 Е/мл).

Для пациентов без видимых признаков болезни значения Cut-off устанавливаются в пределах: 25-40 Ед/мл.

Одни результаты сами по себе не должны быть единственной причиной для каких-либо терапевтических заключений. Результаты должны коррелировать с другими клиническими наблюдениями и диагностическими тестами.

## 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартные правила лабораторной практики требуют, чтобы контроль использовался при каждой калибровочной кривой. Статистически значительное количество контролей должно быть измерено, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, гарантирующие точную работу. Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственному регулированию и нормам федерального права. Использованию контрольных образцов рекомендуется использовать повседневно для проверки подлинности результатов. Используйте контроли на нормальных и на патологических уровнях.

Контрольные значения и соответствующие результаты лаборатории ОТК заявлены в листе контроля качества (КК), вложенном в набор. Значения и диапазоны, обозначенные в листе КК, относятся всегда только к текущей партии (лоту) набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные или международные программы Оценки Качества, чтобы гарантировать точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для того, чтобы проанализировать значения контроля и тренды. Если результаты анализа не вписываются в указанные диапазоны контроля, результаты пациента должны считаться неверными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические аспекты: раскапывание из пипетки и измерительные устройства; фотометр, сроки годности реактивов, условия хранения и инкубации, методы аспирации и промывки.

После проверки вышеупомянутых параметров, не находя ошибки, пожалуйста, свяжитесь с Вашим дистрибьютором или ДРГ непосредственно.

## 10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа в пределах между 0,50 – 200 Е/мл.

### 9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Перекрестной реактивности в данном тесте не выявлено.

### 9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность ДРГ ИФА была вычислена, добавляем 2 среднеквадратичных отклонения к средним из 20 репликатов обследования Нулевого Стандарта (S0), и составила 0,50 Е/мл.

### 9.4 Воспроизводимость

#### 9.4.1В пределах анализа

Вариабельность внутри постановки показана ниже:

| Образец | n  | Средний (Е/мл) | КВ (%) |
|---------|----|----------------|--------|
| 1       | 20 | 2,81           | 7,0    |
| 2       | 20 | 16,1           | 9,7    |
| 3       | 20 | 24,50          | 5,2    |

### 9.4.2Между анализами

Межпостановочная вариабельность показана ниже:

| Образец | n  | Средний (Е/мл) | КВ (%) |
|---------|----|----------------|--------|
| 1       | 40 | 3,1            | 14,5   |
| 2       | 40 | 17,7           | 10,1   |
| 3       | 40 | 19,2           | 7,7    |

## 9.5 Восстановление

Образцы были насыщены добавлением растворов CA 15-3 с известными концентрациями в соотношении 1:1.

Процент восстановления был вычислен умножением отношения измерений и ожидаемых значений на 100 (ожидаемое значение = (эндогенный CA 15-3 + добавленный CA 15-3) / 2; из-за разбавления 1:2 сыворотки с насыщающим материалом).

|                             | Образец 1 | Образец 2 | Образец 3 |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Концентрация [Е/мл]         | 11,9      | 31,9      | 18,0      |
| Среднее Восстановление      | 87,6      | 90,6      | 102,3     |
| Диапазон Восстановления [%] | от        | 85,1      | 85,0      |
|                             | до        | 90,5      | 69,3      |

### 9.6 Линейность

|                             | Образец 1 | Образец 2 | Образец 3 |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Концентрация [Е/мл]         | 24,7      | 23,5      | 21,6      |
| Среднее Восстановление      | 95,5      | 94,9      | 106,9     |
| Диапазон Восстановления [%] | от        | 87,4      | 88,5      |
|                             | до        | 103,6     | 102,1     |

## 11. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены только тогда, когда процедура анализа будет выполнена с полным пониманием инструкции, вложенной в набор, а также когда будет привязка к стандарту GLP.

Любое неправильное обращение с образцами или модификация этого теста могут повлиять на результаты.

### 10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), Билирубин (до 0.125 мг/мл) и Триглицериды (до 30 мг/мл) не имеют никакого влияния на результаты анализа.

Проба содержит реагенты для минимизации вмешательства АМАЧ (антимышиных антител человека) и гетерофильных антитела. Однако, чрезвычайно высокие титры АМАЧ или гетерофильных антител могут повлиять на результаты теста.

### 10.2 Влияние лекарственных средств

До сих пор нам не известны никакие вещества (препараты), которые имеют влияние на измерение CA 19-9 в образце.

### 10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

«Хук-эффект» не наблюдался в этом исследовании до 12 800 Е/мл CA 15-3.

## 12. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

### 11.1 Надежность результатов

Тест должен быть выполнен полностью согласно инструкциям изготовителя для использования. Кроме того пользователь должен строго следовать правилам GLP (Хорошая Лабораторная Практика) или другим доступным национальным стандартам и/или законам. Это особенно важно для использования контрольных реактивов. Важно всегда включать в рамках теста достаточное число контрольной для того, чтобы удостовериться в правильности и точности теста.

Результаты испытаний действительны, только если все контрольные в пределах указанных диапазонов и если все другие параметры теста также в пределах данных спецификаций анализа. В случае любого сомнения или беспокойства, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

### 11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические выводы никогда не должны быть основаны на одних только лабораторных результатах, даже если все результаты испытаний совпадают с вещами, указанными в п. 11.1. Любой лабораторный результат - только часть полной клинической картины пациента.

Только в случаях, когда лабораторные результаты находятся в приемлемом совпадении с полной клинической картиной пациента, делаются терапевтические выводы.

Сам результат испытаний никогда не должен быть единственным определяющим фактором для того, чтобы получить любые терапевтические выводы.

### 11.3 Ответственность

Любая модификация набора и/или замена, или смешивание любых компонентов различных партий от одного набора с другим могут отрицательно повлиять на результаты и валидацию всего теста. Такая модификация и/или замена лишают законной силы любое рекламационное требование.

Рекламационные требования, попадающие под неверное истолкования клиентом лабораторных результатов, указанных в п. 11.2., также не принимаются. Тем не менее, в случае любого требования, ответственность изготовителя не должна превысить стоимость набора. Любой ущерб, нанесенный набору во время транспортировки, не относится к ответственности изготовителя.

### ССЫЛКИ / ЛИТЕРАТУРА

(см. в оригинале инструкции)

### **ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)