

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	9

CONTENT

1. INTENDED USE	10
2. SUMMARY AND EXPLANATION	10
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	11
5. KIT COMPONENTS	12
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	13
7. TEST PROCEDURE	13
8. QUALITY CONTROL	15
9. CALCULATION OF RESULTS	15
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	16
12. LITERATURE	16

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА CA15.3 (M12) В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «CA15.3 (M12)-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «CA15.3 (M12)-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации антигена CA15.3 (M12) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Антиген MUC1 представляет собой гликопротеин гетерогенного состава с молекулярной массой 300–450 кДа. Уровень MUC1 в крови повышается при раке молочной железы (РМЖ). Определение MUC1 в сыворотке или плазме крови используется для мониторинга РМЖ, оценки эффективности лечения и выявления рецидива или метастазов. Данный набор сделан по принципу «гетерогенного сэндвича» – в нем использованы два моноклональных антитела (X108 и X19), выявляющих уникальный иммунодоминантный пептидный повтор TRPAPGS гликопротеина MUC1. Подобные наборы более специфичны, чем тест-системы, сделанные по принципу «гомогенного сэндвича» (например, «MUC1 (M22)-ИФА», кат. № K227 «ХЕМА», или MCA, Roche) или конкурентного связывания (например, «MUC1 (M20)-ИФА», кат. № K228 «ХЕМА», или BR27.29, Fujirebio), но обладают невысокой чувствительностью (не более 75% даже при III стадии РМЖ). Поэтому для оценки эффективности хирургического лечения рекомендуем определять антиген MUC1, используя все три тест-системы (M12, M20 и M22) до и после резекции опухоли. Для дальнейшего послеоперационного мониторинга целесообразно использовать только одну тест-систему, показавшую:

1) наибольший послеоперационный спад в %;

2) при сравнимых значениях этого показателя – более высокое значение концентрации относительно рекомендуемого cut-off.

Если больная не была обследована до операции (например, при отсроченном рецидиве), мы рекомендуем динамическое определение всех трех маркеров (M12, M20 и M22). Кроме РМЖ, повышение уровня MUC1 в крови может наблюдаться при раке легких, яичников, предстательной железы, шейки матки и желудочно-кишечного тракта. Повышение содержания MUC1 может развиваться и при некоторых доброкачественных процессах: доброкачественных опухолях молочной железы и яичников, эндометриозе, гепатите, циррозе печени, фиброзе легких. Беременность и лактация также могут приводить к повышению уровня MUC1.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение антигена СА15.3 (М12) основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к СА15.3 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание СА15.3 (М12), содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к СА15.3 человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена СА15.3 (М12) в исследуемом образце. Концентрацию антигена СА15.3 (М12) в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания антигена СА15.3 (М12) в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к СА15.3 человека с другими аналитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
КЭА	<0.1
СА125	<0.1
СА19.9	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания СА15.3 (М12) в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СА15.3 (М12)-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации СА15.3 (М12) в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей СА15.3 (М12), имеет линейный характер в диапазоне концентраций 12.5–250 Ед/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА15.3 (М12) предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «СА15.3 (М12)-ИФА» концентрация СА15.3 (М12) в сыворотке (плазме) крови не превышает 1.5 Ед/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P226Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C226Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (pH 7.2-7.4), содержащие известные количества СА15.3 (M12) – 0; 12.5; 50; 125; 250 Ед/мл , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q226Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антигена СА15.3 (M12), готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T226Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S011Z	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензида (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K226I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «СА15.3 (M12)-ИФА»	1	шт.	-
11 K226Q		Паспорт контроля качества Набора реагентов «СА15.3 (M12)-ИФА»	1	шт.	

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- орбитальный шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600–800 об./мин.
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «CA15.3 (M12)-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации антигена CA15.3 (M12) в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация SA15.3 (M12) в исследуемом образце превышает 250 Ед/мл, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки планшета по 50 мкл ИФА-Буфера.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600–800 об./мин.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600–800 об./мин.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

продолжение таблицы на стр. 8

12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация SA15.3 (M12) в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсега (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание SA15.3 (M12) в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п. 2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций SA15.3 (M12) в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (1.5 Ед/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (250 Ед/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация SA15.3 (M12) ниже 1.5 Ед/мл или выше 250 Ед/мл.

Исследуемая группа	Единицы, Ед/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	-	30
Женщины	-	30
Беременные:		
1-й триместр	-	55
2-й триместр	5.0	65
3-й триместр	5.0	185
В период лактации	-	120

11. ЛИТЕРАТУРА

1. McGuire WL, Tandon AK, Allred D, Chamnes GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node negative breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 1990; 82:1006-7.
2. 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.
3. Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. C-erb B-2 overexpression and histological type of in-situ and invasive breast carcinoma. J Clin Pathol 1992;45-16-20.
4. Ueronese S, Gambacorta M. Detection of Ki-67 rate in breast cancer. AM J Clin Pathol 1991; 95:30-4.
5. Lotnickier M, Pavesi F, Scarabelli M. Tumor associated antigens CA15-3 and CA125 in ovarian cancer. Int. J. Biolog Markers 1991; 6:115

По вопросам, касающимся качества Набора **«CA15.3 (M12)-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CA15.3 (M12) IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of CA15.3 (M12) in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of CA15.3 (M12) in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

CA15-3 or MUC1 is a heterogenous glycoprotein with a molecular mass ca. 300-450 kD. Elevation of serum CA15-3 is associated with mammary carcinomas. Quantitative determination of CA15-3 in serum and plasma is helpful in monitoring of patients with such tumours to estimate the course of the disease, effectiveness of its treatment and to reveal recurrence or metastases. However, CA15-3 values obtained should always be interpreted in context of results obtained by other diagnostic and clinical procedures. Besides mammary carcinomas, CA15-3 levels in blood may rise in lung tumours, prostate cancer, ovarian carcinomas, gastro-intestinal tumours. Elevation of CA15-3 level in blood can be also found in benign tumours of the mammary gland and the ovary, endometriosis, hepatitis, liver cirrhosis and lung fibrosis. Pregnancy and lactation may also cause elevation of CA15-3 level in serum.

All CA15-3 test systems are usually not very sensitive (not more than 75% even at stage III mammary carcinoma). Therefore, in monitoring of tumours, we recommend to use this test in conjunction with two other test systems designed by XEMA for diagnostics and monitoring of mammary carcinomas – M20 (analogous to BR27.29 developed by Biomira) and M22 (analogous to MCA, Roche). All three systems should be used to evaluate MUC1 concentration before and after surgery; the test system showing the most pronounced postsurgery decline should be then used for further monitoring.

NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy may develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies gives false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated by depleting adsorbents before assaying.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human CA15.3-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies – murine monoclonal to human CA15.3, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H_2SO_4 . It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Contents of the Kit

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components	
1	SORB MTP CA15.3 (M12) EIA strips, 8x12 wells		1	pcs	until exp.date	
2	CAL 1-5 Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 5 calibrators: 0.12, 5, 50, 125, 250 U/ml		5	pcs	red (C1 - colourless)	2 months
3	CONTROL Control serum (0.8 ml)		1	pcs	colourless	2 months
4	CONJ HRP Conjugate, 11 ml		1	pcs	red	until exp.date
5	DIL EIA buffer 11 ml		1	pcs	blue	until exp.date
6	SUBS TMB Substrate solution, 11 ml		1	pcs	colourless	until exp.date
7	BUF WASH 21X Washing solution concentrate 21x, 22 ml		1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2...+8 °C or 5 days at RT
8	STOP Stop solution, 11 ml		1	pcs	colourless	until exp.date
9	N003 Plate sealing tape		2	pcs		N/A
10	K226I Instruction CA15.3 (M12) EIA		1	pcs		N/A
11	K226Q QC data sheet CA15.3 (M12) EIA		1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Microtiter plate shaker. Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 600–800/min
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1.** Reagent Preparation

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using DIL (EIA buffer). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Pipet 50 µl of EIA buffer into each well.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 30 minutes at +18...+25 °C and continuous shaking at 600-800 rpm
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
7	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
8	Incubate 30 minutes at +18...+25 °C and continuous shaking at 600-800 rpm
9	Wash the strips 5 times.
10	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
11	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
12	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
13	Measure OD (optical density) at 450 nm.
14	Set photometer blank on first calibrator
15	Apply point-by-point method for data reduction.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

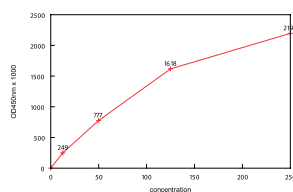
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus CA15.3 (M12) concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of CA15.3 (M12) in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 U/ml	0.06
CAL 2	12.5 U/ml	0.31
CAL 3	50 U/ml	0.84
CAL 4	125 U/ml	1.68
CAL 5	250 U/ml	2.26



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for CA15.3 (M12). Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, U/ml	
	Lower limit	Upper limit
Males	-	30
Females	-	30
Pregnancy week:		
1st trimester	-	55
2nd trimester	5.0	65
3rd trimester	5.0	185
Lactation	-	120

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
CEA	<0.1
CA125	<0.1
CA19.9	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 1.5 U/ml.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different CA15.3 (M12) concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known CA15.3 (M12) concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

- McGuire WL, Tandon AK, Allred D, Chamnes GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node negative breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 1990; 82:1006-7.
- 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.
- Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. C-erb B-2 overexpression and histological type of in-situ and invasive breast carcinoma. J Clin Pathol 1992;45-16-20.
- Ueronese S, Gambacorta M. Detection of Ki-67 rate in breast cancer. AM J Clin Pathol 1991; 95:30-4.
- Lotnick M, Pavesi F, Scarabelli M. Tumor associated antigens CA15-3 and CA125 in ovarian cancer. Int. J. Biolog Markers 1991; 6:115