



CA 15-3-IRMA

KIP0321

For Informational/Research Purposes Only

Distributed By:



Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-America)

8201 Central Ave. NE, Suite P

Minneapolis, Minnesota 55432, USA

Phone: (888) 523-1246

Fax.: (763) 780-2988

Email: info@ibl-america.com

Web: www.ibl-america.com

For Informational/Research Purposes Only

LOT : 110218/1

Read entire protocol before use.

CA 15-3-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative determination of the cancer associated antigen MUC-1 (CA 15-3) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource CA 15-3-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP0321 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

The CA 15-3 antigen is a high-molecular-weight mucin glycoprotein termed MUC-1. It has been characterized with monoclonal antibodies developed against purified extracts of a membrane fraction isolated from a human breast carcinoma (clone DF3) and against human milk fat globule membrane (clone 115D8).

Other names for the mucin include polymorphic epithelial mucin (PEM), epithelial membrane antigen (MEA) or episalin.


B. Clinical applications

This marker is most useful in evaluating the effect of treatment for women with advanced breast cancer. Elevated levels of CA15-3 are also associated with cancers of the ovary, lung and prostate, as well as non-cancerous conditions such as benign breast or ovarian disease, endometriosis, pelvic inflammatory disease and hepatitis. Pregnancy and lactation also can raise CA 15-3 levels.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource CA 15-3-IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mab1, the capture antibody, is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Add calibrators or samples to the tubes. After incubation, washing removes the occasional excess of antigen. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. .

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti CA 15-3(monoclonal antibody)	2 x 48	ivory	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="124 577 258 629"> <tr> <td>Ab</td> <td>^{125}I</td> </tr> </table> Anti-CA 15-3- ^{125}I (monoclonal antibody) in phosphate buffer with bovine serum, azide (<0.1%) and inert red dye	Ab	^{125}I	1 vial 6.0 ml 870 kBq	red	Ready for use	
Ab	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="124 779 258 831"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators 1-5 in phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol (<0.1%). See exact value on vial labels. Calibrators are prediluted	CAL	N	5 vials lyophilised	yellow	Add 0.5 ml dilution buffer	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="113 992 280 1043"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Dilution buffer: phosphate buffer with bovine serum and azide (<0.1%)	DIL	BUF	1 vial 26 ml	black	Ready for use	
DIL	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1155 323 1207"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	2 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="82 1267 280 1319"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note: use the dilution buffer as zero calibrator.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μl , 200 μl and 500 μl (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Plastic tubes for dilution of samples
4. Vortex mixer
5. Tube shaker (400 rpm)
6. Magnetic stirrer
7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 0.5ml dilution buffer.
- B. Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20°C for 3 months.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 h., storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label one plain plastic tube for each sample and control.
2. Dispense 500 μl of Dilution Buffer into each tube.
3. Add 20 μl of sample and controls into these tubes.
4. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
5. Briefly vortex calibrators, pre-diluted samples and controls and dispense 50 μl of each into the respective tubes.
6. Incubate for 90 minutes at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
7. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
8. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
9. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Dispense 50 μl of ^{125}I Iodine labelled anti CA15-3 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
12. Incubate for 90 minutes at room temperature on a tube shaker(400 rpm).
13. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
14. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
15. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
16. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
17. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of CA 15-3 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

CA 15-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		258080	100
Calibrator	0.0 U/ml	415	0.16
	2.86 U/ml	2440	0.95
	9.10 U/ml	6957	2.70
	28.30 U/ml	18367	7.12
	104.00 U/ml	48032	18.61
	331.00 U/ml	89798	34.79

Since no international reference material is available for CA 15-3 antigen, DIAsource CA 15-3-IRMA calibrator values are assigned against a set of in-house reference standards.

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 0.33 U/ml.

B. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)
A	20	14.2 ± 0.4	2.7	A	20	12.8 ± 0.8	6.4
B	20	94.1 ± 2.8	3.0	B	20	86.9 ± 5.4	6.2

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

C. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (U/ml)	Measured Concent. (U/ml)
A	1/1	-	184.61
	1/2	92.31	91.79
	1/4	46.15	46.70
	1/8	23.08	22.33
	1/16	11.54	11.34
	1/32	5.77	5.61

Samples were diluted with Dilution Buffer.

RECOVERY TEST

Added CA 15-3 (U/ml)	Recovered CA 15-3 (U/ml)	Recovery (%)
21.80	20.48	93.9
43.75	43.34	99.1
80.91	81.59	100.8
169.92	164.18	96.6
307.87	299.60	97.3

D. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	11.4	11.4	11.4	11.2
S 2 (U/ml)	187.7	183.3	187.2	187.2

E. Hook-effect

Samples containing 100.000 U/ml CA15-3 give a result higher than the last calibration point.

F. Specificity

The DIAsource CA 15-3 IRMA is based on two mouse monoclonal antibodies, the catching MAb Ma695 targeting a sialylated carbohydrate epitope and the detecting MAb Ma 552 targeting the PDTRPAG hydrophilic peptide of the protein core.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practices.

XVI. REFERENCE INTERVALS

Among 232 apparently healthy individuals, 99% of the results were below 30.0 U/ml.

For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history and other findings.

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in All

animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

- GENDLER SJ, SPICER AP. +
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
- KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
- DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
- COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
- SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
- CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
- MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.
- GION M, PELOSO L, et al.
Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up time.
Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	DILUTED SAMPLE CONTROLS µl
Calibrators (0 to 5)	-	50	-
Diluted Samples, controls	-	-	50
Incubation	90 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant) 2 ml	
Working Wash solution		Aspirate (or decant) 2 ml	
Separation		Aspirate (or decant) 2 ml	
Working Wash solution		Aspirate (or decant) 2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Tracer	50	50	50
Incubation	90 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant) 2 ml	
Working Wash solution		Aspirate (or decant) 2 ml	
Separation		Aspirate (or decant) 2 ml	
Working Wash solution		Aspirate (or decant) 2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP0321	P.I. Number : 1700864/en	Revision nr : 110218/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2011-02-18

For Informational/Research Purposes Only

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

CA 15-3-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'antigène MUC-1 associé au cancer (CA 15-3) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource CA 15-3-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP0321 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. *Activités biologiques*

L'antigène CA 15-3 est une glycoprotéine mucine d'un poids moléculaire élevé appelée MUC-1. Il a été caractérisé avec des anticorps monoclonaux développés contre des extraits purifiés d'une fraction de membrane isolée d'un carcinome du sein humain (clone DF3) et contre les globules gras de lait humain (clone 115D8).

Les autres noms de la mucine sont : la mucine épithéliale polymorphique (PEM), l'antigène de membrane épithéliale (MEA) ou l'épissaline.

B. *Application clinique*

Ce marqueur est le plus utile dans l'évaluation de l'effet du traitement chez des femmes souffrant d'un cancer du sein avancé. Des taux élevés de CA 15-3 sont également associés aux cancers de l'ovaire, du poumon et de la prostate, ainsi qu'à des états non cancéreux comme une maladie bénigne du sein ou de l'ovaire, l'endométriose, une maladie pelvienne inflammatoire et une hépatite. La grossesse et la lactation peuvent également faire augmenter les taux de CA 15-3.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource CA 15-3-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique en deux étapes basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Les AcM1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube en plastique. Ajouter les calibrateurs ou les échantillons aux tubes. Après incubation, laver l'excès occasionnel d'antigène. L'addition de AcM2, l'anticorps signal marqué avec l'¹²⁵I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 96 analyses	Code Couleur	Reconstitution			
Tubes recouverts avec l'anti CA 15-3 (anticorps monoclonal)	2 x 48	Ivoire	Prêt à l'emploi			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>Ab</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> TRACEUR: CA 15-3 marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec du sérum bovin, de l'azote de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 6,0 ml 870 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrateur N = 1 à 5 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans un tampon phosphate avec l'albumine bovine et du thymol (<0,1%) Les calibrateurs sont pré-dilués	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml de tampon de dilution	
CAL	N					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampon de dilution: tampon phosphate avec du sérum bovin et de l'azote de sodium (<0,1%)	DIL	BUF	1 flacon 26 ml	Noir	Prêt à l'emploi	
DIL	BUF					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	2 flacons 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note: utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 200 µl et 500 µl (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Tubes en plastique pour la dilution des échantillons
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de tubes (400rpm)
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml de tampon de dilution.
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables. Utiliser les immédiatement après leur reconstitution. Congeler immédiatement en aliquotes et conserver les à -20°C pendant trois mois au maximum.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Etiqueter un tube en plastique ordinaire pour chaque échantillon et contrôle.
- Distribuer 500 µl de tampon de dilution dans chaque tube.
- Ajouter 20 µl d'échantillon et de contrôle dans ces tubes.
- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons pré-dilués et les contrôles. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Incuber pendant 90 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
- Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décantier).
- Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décantier) le reste de liquide.
- Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- Incuber pendant 90 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
- Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décantier).

18. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
19. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en CA 15-3 (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

CA 15-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		258080	100
Calibrateur	0,0 U/ml	415	0,16
	2,86 U/ml	2440	0,95
	9,10 U/ml	6957	2,70
	28,30 U/ml	18367	7,12
	104,00 U/ml	48032	18,61
	331,00 U/ml	89798	34,79

Comme on ne dispose pas de matériel international de référence pour l'antigène CA 15-3, les valeurs du calibrateur DIASource CA 15-3-IRMA sont attribuées à un jeu de standards de référence internes.

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,33 U/ml.

B. Spécificité

Le DIASource CA 15-3 IRMA est basé sur deux anticorps monoclonaux de souris, le AcM capteur Ma695 ciblant un épitope hydrate de carbone sialylé et l'AcM détecteur Ma 552 ciblant le peptide PDTRPAPG hydrophile de la protéine de noyau.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)
A	20	14,2 ± 0,4	2,7	A	20	12,8 ± 0,8	6,4
B	20	94,1 ± 2,8	3,0	B	20	86,9 ± 5,4	6,2

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

CA 15-3 ajoutée (U/ml)	CA 15-3 récupérée (U/ml)	Récupération (%)
21,80	20,48	93,9
43,75	43,34	99,1
80,91	81,59	100,8
169,92	164,18	96,6
307,87	299,60	97,3

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (U/ml)	Concent. Mesurée (U/ml)
A	1/1	-	184,61
	1/2	92,31	91,79
	1/4	46,15	46,70
	1/8	23,08	22,33
	1/16	11,54	11,34
	1/32	5,77	5,61

Les échantillons ont été dilués avec le tampon de dilution.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	11,4	11,4	11,4	11,2
S 2 (U/ml)	187,7	183,3	187,2	187,2

F. Effet crochet

Les échantillons contenant 100.000 U/ml de CA 15-3 donnent un résultat supérieur au dernier point de calibration.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques *in vitro*.
Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés en aliquotes. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation de la différence entre les résultats des échantillons analysés en double doivent être basés sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Parmi 232 individus apparents en bonne santé, 99% des résultats étaient en dessous de 30,0 U/ml.

Pour être utilisés à des fins diagnostiques, les résultats obtenus avec cet essai doivent toujours être utilisés en combinaison avec l'examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres constatations.

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azote de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azote de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azote dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- GENDLER SJ, SPICER AP.+
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
- KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
- DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
- COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
- SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
- CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
- MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.

- GION M, PELOSO L, et al.

Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up-time.

Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRATEURS (ml)	ECHANTILLONS DILUES, CONTRÔLES (ml)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons dilués, Contrôle	- -	0,05 -	- 0,05
Incubation	90 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 aspiration 2,0 aspiration	
Traceur	0,05	0,05	0,05
Incubation	90 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 aspiration 2,0 aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Numéro de catalogue DIAsource : KIP0321	Numéro de P.I. : 1700864/fr	Numéro de révision : 110218/1
--	--------------------------------	----------------------------------

Date de révision : 2011-02-18

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

CA 15-3-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung des tumorassoziierten Antigens MUC-1 (CA 15-3) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource CA 15-3-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0321 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. *Biologische Aktivitäten*

Das CA 15-3 Antigen ist ein hochmolekulares Glykoprotein, genannt MUC-1-Muzin. Es wurde charakterisiert mit monoklonalen Antikörpern, entwickelt gegen gereinigte Extrakte einer, aus humanem Brustkarzinom (Klon DF3) isolierten, Membranfraktion und gegen humane globuläre, MilCHFett, Membranen (Klon 115D8).

Zu den anderen Namen für das Muzin gehören das polymorphe epitheliale Muzin (PEM), das epitheliale Membranantigen (MEA) oder Episalin .

B. *Klinische Anwendung*

Dieser Marker ist sehr nützlich in der Bewertung der Behandlungsergebnisse bei Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs. Erhöhte CA15-3 Werte werden ebenso assoziiert mit Tumoren der Ovarien, Lunge und Prostata als auch mit Krankheitszuständen ohne Tumorbeteiligung wie benignen Erkrankungen der Brust oder Ovarien, der Endometriose, der entzündlichen Erkrankungen des Unterleibs und Hepatitis. Schwangerschaft und Stillen können ebenso zu erhöhten CA 15-3 Werten führen.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource CA 15-3-IRMA ist ein Zwei-Schritt immunradiometrischer Assay in beschichteten Röhrchen. Mab1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. Hinzugabe der Kalibratoren und Proben in die Röhrchen. Nach der Inkubation durch Waschen gelegentlichen Überschuss an Antigenen entfernen. Zugabe von Mab2, des mit ¹²⁵I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution
Mit anti CA 15-3-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	cremeweiß	gebrauchsfertig
Ab ¹²⁵ I TRACER: ¹²⁵ Iodmarkierter Anti-CA 15-3 (monoklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserum, Azid (<0.1%) und inertem roten Farbstoff	1 Gefäß 6,0 ml 870 kBq	rot	gebrauchsfertig
CAL N Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol (<0,1%) Kalibratoren sind vorverdünnt	5 Gefäße lyophilisiert	gelb	0,5 ml Verdünnungspuffer zugeben
DIL BUF Verdünnungspuffer: in Phosphatpuffer mit Rinderserum und Azid (<0.1%)	1 Gefäß 26 ml	schwarz	gebrauchsfertig
WASH SOLN CONC Waschlösung (Tris-HCl)	2 Gefäße 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 or 2 Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 50 µl, 200 µl und 500 µl (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Plastikröhrchen zur Verdünnung der Proben
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Vortex Mixer
- Schüttler für Röhrchen (400rpm)
- Magnetrührer
- Jegl. Gamma-Counter, der 125I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5ml Verdünnungspuffer.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Die Kalibratoren und Proben sind sehr instabil. Benutzung sofort nach der Rekonstitution oder sofort in Aliquots bei -20°C für bis zu 3 Monate einfrieren.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

- Etikettieren Sie ein normales Plastikröhrchen für jede Probe und Kontrolle.
- Dispensieren Sie 500 µl des Verdünnungspuffers in jedes Röhrchen.
- Geben Sie 20 µl der Probe und Kontrolle in diese Röhrchen.
- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, vorverdünnte Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 50 µl in ihre Röhrchen.
- Inkubieren Sie 90 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Inkubieren Sie 90 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.

- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration CA 15-3 (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

CA 15-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		258080	100
Kalibrator	0,0 U/ml	415	0,16
	2,86 U/ml	2440	0,95
	9,10 U/ml	6957	2,70
	28,30 U/ml	18367	7,12
	104,00 U/ml	48032	18,61
	331,00 U/ml	89798	34,79

Weil kein internationales Referenzmaterial für das CA 15-3 Antigen erhältlich ist, werden DIASource CA 15-3-IRMA Kalibrationswerte gegen ein Set von in-house Referenzstandards bestimmt.

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,33 U/ml.

B. Spezifität

Der DIASource CA 15-3 IRMA basiert auf 2 monoklonalen Antikörpern aus Mäusen, wobei das Fänger-Antigen MAb Ma695 zielgerichtet ein sialysiertes Kohlenhydrat Epitop und das Detektions-Antigen MAb Ma 552 zielgerichtet das PDTRPAPG hydrophile Peptid des Core-Proteins bindet.

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)
A	20	14,2 ± 0,4	2,7	A	20	12,8 ± 0,8	6,4
B	20	94,1 ± 2,8	3,0	B	20	86,9 ± ,5,4	6,2

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST		
Zugeg. CA 15-3 (U/ml)	Wiedergef. CA 15-3 (U/ml)	Wiedergefunden (%)
21,80	20,48	93,9
43,75	43,34	99,1
80,91	81,59	100,8
169,92	164,18	96,6
307,87	299,60	97,3

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (U/ml)	Gemess. Konz. (U/ml)
A	1/1	-	184,61
	1/2	92,31	91,79
	1/4	46,15	46,70
	1/8	23,08	22,33
	1/16	11,54	11,34
	1/32	5,77	5,61

Die Proben wurden mit Verdünnungspuffer verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	11,4	11,4	11,4	11,2
S 2 (U/ml)	187,7	183,3	187,2	187,2

F. Hook-Effekt

Proben, die 100000 U/ml CA 15-3 enthalten, ergeben ein höheres Resultat als der letzte Kalibrationspunkt.

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren. Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden. Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XVI. REFERENZINTERVALLE

Unter 232 anscheinend gesunden Einzelpersonen, 99% der Resultate waren unter 30,0 U/ml.

Für diagnostische Zwecke sollten die durch diesen Assay erzielten Ergebnisse nur in Verbindung mit klinischen Untersuchungen, der Patientengeschichte und anderen Befunden genutzt werden.

XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschröte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVIII. LITERATUR

- GENDLER SJ, SPICER AP.+
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
- KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
- DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
- COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
- SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
- CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
- MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.
- GION M, PELOSO L, et al.
Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up time.
Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA- TOREN (ml)	VERDÜNNTE PROBEN, KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-5) Verdünnte Proben, Kontrollen	- -	0,05 -	- 0,05
Inkubation	90 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Tracer	0,05	0,05	0,05
Inkubation	90 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DIASource Katalognummer : KIP0321	Beipackzettelnummer: 1700864/de	Nummer der Originalausgabe: 110218/1
---	------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2011-02-18

Leer el protocolo completo antes de usar.

CA 15-3-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del antígeno MUC-1 (CA 15-3), asociado al cáncer, en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource CA 15-3-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP0321 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades Biológicas

El antígeno CA 15-3 es una glucoproteína mucina de gran peso molecular denominada MUC-1. Se ha caracterizado con anticuerpos monoclonales desarrollados contra extractos purificados de una fracción de membrana aislada de un carcinoma de mama (clon DF3) y contra la membrana humana del glóbulo gordo de leche (clon 115D8).

Entre otros nombres que recibe la mucina se incluyen mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno de membrana epitelial (MEA) o episalina.

B. Aplicación clínica

Este marcador resulta especialmente útil para evaluar el efecto del tratamiento en mujeres con cáncer de mama avanzado. Un nivel elevado de CA15-3 también se asocia a cáncer de ovario, pulmón y próstata, así como a condiciones no cancerígenas, como patologías benignas de mama o de ovario, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica y hepatitis. El embarazo y la lactancia también pueden aumentar los niveles de CA 15-3.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

CA 15-3-Irma de DIASource es un radioinmunoensayo en dos pasos basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte interior inferior de las paredes del tubo de poliestireno. Añada calibradores o muestras a los tubos. Después de la incubación, el lavado elimina el exceso ocasional de antígeno. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ^{125}I , completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti CA 15-3 (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	marfil	Listo para uso
Ab ^{125}I TRAZADOR: anti-CA 15-3 (anticuerpos monoclonales) marcado con ^{125}I en tampón fosfato con suero bovino, azida (<0.1%) y un colorante rojo inerte	1 vial 6,0 ml 870 kBq	rojo	Listo para uso
CAL N Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfato con albúmina bovina y thymol (0,1%) Los calibradores se prediluyen	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de tampón de dilución
DIL BUF Tampón de dilución: tampón fosfato con suero bovino e azida (<0.1%)	1 vial 26 ml	Negro	Listo para uso
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tris-HCl)	2 viales 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en suero humano y thymol	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: utilice el tampón de dilución como calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 μl , 200 μl y 500 μl (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos de plástico para dilución de las muestras
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Agitador de tubos (400rpm)
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir ^{125}I (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 0,5 ml de tampón de dilución.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.

- Los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes alícuotas y mantenerse a -20° C durante 3 meses.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorará la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Etiquetar un tubo normal de plástico por cada muestra y control.
2. Dispensar 500 μl de tampón de dilución en cada tubo.
3. Añadir 20 μl de muestra y controles en esos tubos.
4. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
5. Agitar brevemente los calibradores, muestras prediluidas y controles y dispensar 50 μl de cada uno en sus respectivos tubos.
6. Incubar durante 90 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
7. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
8. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
9. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
10. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
11. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
12. Dispensar 50 μL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
13. Incubar durante 90 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
14. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
15. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
16. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
17. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
18. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
19. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o lineal las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de CA 15-3 (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.

- Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
- Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

CA 15-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		258080	100
Calibrador	0,0 U/ml	415	0,16
	2,86 U/ml	2440	0,95
	9,10 U/ml	6957	2,70
	28,30 U/ml	18367	7,12
	104,00 U/ml	48032	18,61
	331,00 U/ml	89798	34,79

Ya que no hay material de referencia internacional disponible para el antígeno CA 15-3, los valores del calibrador DIAsource CA 15-3-IRMA se asignan respecto a un conjunto de estándares de referencia internos.

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,33 U/ml.

B. Especificidad

El calibrador DIAsource CA 15-3 IRMA está basado en dos anticuerpos monoclonales de ratón, el MAb Ma695 de captura, dirigido a un epítipo de carbohidratos sialilados; y el MAb Ma 552 de detección, dirigido al péptido hidrofílico PDTRPAG del núcleo de la proteína.

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)
A	20	14,2 ± 0,4	2,7	A	20	12,8 ± 0,8	6,4
B	20	94,1 ± 2,8	3,0	B	20	86,9 ± 5,4	6,2

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (U/ml)	Concent. Medida (U/ml)
A	1/1	-	184,61
	1/2	92,31	91,79
	1/4	46,15	46,70
	1/8	23,08	22,33
	1/16	11,54	11,34
	1/32	5,77	5,61

Las muestras fueron diluidas con el tampón de dilución.

TEST DE RECUPERACIÓN

CA 15-3 añadido (U/ml)	CA 15-3 Recuperado (U/ml)	Recuperado (%)
21,80	20,48	93,9
43,75	43,34	99,1
80,91	81,59	100,8
169,92	164,18	96,6
307,87	299,60	97,3

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	11,4	11,4	11,4	11,2
S 2 (U/ml)	187,7	183,3	187,2	187,2

F. Efecto "hook"

Las muestras que contienen 100.000 U/ml de CA 15-3 proporcionan un resultado superior al del último punto de calibración.

XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

Entre 232 individuos al parecer sanos, los 99% de los resultados estaban debajo de 30,0 U/ml.

Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos en este ensayo siempre deben utilizarse en combinación con el examen clínico, el historial médico del paciente y otros resultados.

XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenece el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV,

anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- GENDLER SJ, SPICER AP.+
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
- KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
- DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
- COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
- SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
- CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
- MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.
- GION M, PELOSO L, et al.
Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up time.
Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADOR ES (µl)	MUESTRAS DILUIDAS, CONTROL(ES) (µl)
Calibradores (0 al 5) Muestras diluidas, controles	- -	50 -	- 50
Incubación	90 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación Solución de Lavado Separación Solución de Lavado Separación	- - - - -		aspirar 2,0 ml aspirar 2,0 ml aspirar
Trazador	50	50	50
Incubación	90 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación Solución de Lavado Separación Solución de Lavado Separación	- - - - -		aspirar 2,0 ml aspirar 2,0 ml aspirar
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP0321	P.I. Numero : 1700864/es	Revisión nr : 110218/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2011-02-18

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

CA 15-3-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'antigene MUC-1 (CA 15-3), associato alle neoplasie, nel siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource CA 15-3-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0321: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'antigene CA 15-3 è una glicoproteina mucina ad elevato peso molecolare denominata MUC-1. È stato caratterizzato con anticorpi monoclonali sviluppati contro estratti purificati di una frazione di membrana isolata da un carcinoma mammario umano (clone DF3) e contro la membrana del globulo del grasso del latte (clone 115D8).

La mucina viene anche denominata come mucina epiteliale polimorfica (PEM, polymorphic epithelial mucin), antigene di membrana epiteliale (MEA, epithelial membrane antigen) o episialina.


B. Applicazioni cliniche

Questo marker è molto utile nella valutazione degli effetti del trattamento per le donne con carcinoma mammario avanzato. Livelli elevati di CA15-3 sono inoltre associati ai carcinomi di ovaio, polmone e prostata, come pure a condizioni non cancerose quali le patologie mammarie/ovariche benigne, le endometriosi, le patologie infiammatorie della pelvi e l'epatite. Anche la gravidanza e l'allattamento possono far innalzare i livelli di CA 15-3.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DIAsource CA 15-3-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico a due fasi con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Aggiungere i calibratori o i campioni alle provette. Dopo incubazione, lavare per rimuovere l'eventuale eccesso di antigene. L'aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con ^{125}I , provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di CA 15-3 in standard e campioni.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti CA 15-3 (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Avorio	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="119 660 247 694"> <tr> <td>Ab</td> <td>^{125}I</td> </tr> </table> Marcato: anti-CA 15-3 (Anticorpi monoclonali) marcati con ^{125}I in tampone fosfato con siero bovino, sodio azide (<0,1%) e un colorante inerte rosso	Ab	^{125}I	1 flacone 6,0 ml 870 kBq	Rosso	Pronto per l'uso	
Ab	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="103 840 231 873"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%) I calibratori sono pre-diluiti	CAL	N	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di tampone di diluizione	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="119 1030 279 1064"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone diluizione: tampone fosfato con siero bovino e sodio azide (<0,1%)	DIL	BUF	1 flacone 26 ml	Nero	Pronto per l'uso	
DIL	BUF					
<table border="1" data-bbox="79 1176 263 1209"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	2 flaconi 10 ml	Bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="79 1299 287 1332"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano, contenente timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note: utilizzare il tampone di diluizione come calibratore zero.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 μl , 200 μl e 500 μl (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Provette in plastica per la diluizione dei campioni
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico.
6. Agitatore rotante (400rpm)
7. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
8. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
9. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 0,5ml di tampone di diluizione.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.

- Calibratori e controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 3 mesi.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

1. Etichettare una provetta in plastica pulita per ogni campione e controllo.
2. Distribuire 500 μl di tampone di diluizione in ogni provetta.
3. Aggiungere 20 μl di campione e controlli in queste provette.
4. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
5. Agitare brevemente su vortex standard campioni pre-diluiti e controlli. Dispensare 50 μl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
6. Incubare 90 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
7. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
8. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
9. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
10. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
11. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
12. Dispensare 50 μl di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
13. Incubare 90 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
14. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
15. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
16. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
17. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
18. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
19. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di CA 15-3. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
4. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

Il sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di CA 15-3 in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

CA 15-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		258080	100
Calibratore	0,0 U/ml	415	0,16
	2,86 U/ml	2440	0,95
	9,10 U/ml	6957	2,70
	28,30 U/ml	18367	7,12
	104,00 U/ml	48032	18,61
	331,00 U/ml	89798	34,79

Dal momento che non è disponibile materiale di riferimento internazionale per l'antigene CA 15-3, i valori del calibratore DIAsource CA 15-3-IRMA sono assegnati rispetto a un set di standard di riferimento in-house.

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,33 U/ml.

B. Specificità

Il DIAsource CA 15-3 IRMA si basa su due anticorpi monoclonali di topo, l'anticorpo "catcher" MAb Ma695 che ha come bersaglio un epitopo carboidrato sialilato e l'anticorpo di rilevamento MAb Ma 552 che ha come bersaglio il peptide idrofilo PDTRPAPG del core proteico.

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (U/ml)	CV (%)
A	20	14,2 ± 0,4	2,7	A	20	12,8 ± 0,8	6,4
B	20	94,1 ± 2,8	3,0	B	20	86,9 ± 5,4	6,2

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (U/ml)	Concentrazione misurata (U/ml)
A	1/1	-	184,61
	1/2	92,31	91,79
	1/4	46,15	46,70
	1/8	23,08	22,33
	1/16	11,54	11,34
	1/32	5,77	5,61

I campioni sono stati diluiti con Tampone di diluizione.

TEST DI RECUPERO

CA 15-3 aggiunta (U/ml)	CA 15-3 recuperata (U/ml)	Recupero (%)
21,80	20,48	93,9
43,75	43,34	99,1
80,91	81,59	100,8
169,92	164,18	96,6
307,87	299,60	97,3

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	11,4	11,4	11,4	11,2
S 2 (U/ml)	187,7	183,3	187,2	187,2

E. Effetto hook

I campioni contenenti 100.000 U/ml CA 15-3 danno un risultato maggiore rispetto all'ultimo punto di calibrazione.

XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Fra 232 individui apparentemente in buona salute, 99% dei risultati erano inferiore a 30,0 U/ml.

Per fini diagnostici, i risultati di questo dosaggio devono essere sempre utilizzati come complemento ad esami clinici, dati anamnestici e altro.

XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti. Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I

componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- GENDLER SJ, SPICER AP.+
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
- KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
- DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
- COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
- SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
- CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
- MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.
- GION M, PELOSO L, et al.
Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up time.
Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	CAMPIONI DILUITI Controlli ml
Calibratore (0 - 5) Campioni diluiti, controlli	- -	50 -	- 50
Incubazione	90 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			Aspirare 2 ml
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			Aspirare 2 ml
Separazione			Aspirare
Marcato	50	50	50
Incubazione	90 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			Aspirare 2 ml
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			Aspirare 2 ml
Separazione			Aspirare
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0321	P.I. numero : 1700864/it	Revisione numero : 110218/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2011-02-18



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

CA 15-3-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικής εξέτασης για τον in vitro ποσοτικό προσδιορισμό στον ορό του αντιγόνου MUC-1 (CA 15-3) που σχετίζεται με τον καρκίνο.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ CA 15-3-IRMA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP0321: 96 εξετάσεις
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογικές δράσεις

Το αντιγόνο CA 15-3 είναι μια γλυκοπρωτεϊνική βλεννίνη υψηλού μοριακού βάρους προσδιοριζόμενη MUC-1. Έχει χαρακτηριστεί με μονοκλωνικά αντισώματα που αναπτύχθηκαν ενάντια σε κεκαθαρμένα εκχυλίσματα από τμήμα μεμβράνης από ανθρώπινο καρκίνωμα του μαστού (κλώνος DF3) και ενάντια σε επιφανειακή μεμβράνη κυττάρων που παράγουν λιποσφαιρίνη γάλακτος ανθρώπειο (κλώνος 115D8). Άλλες ονομασίες για τη βλεννίνη περιλαμβάνουν την πολυμορφική επιθηλιακή βλεννίνη (PEM), το επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο (MEA) ή την επισιελίνη.


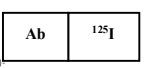

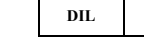
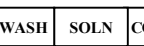

B. Κλινική εφαρμογή

Αυτός ο δείκτης είναι κυρίως χρήσιμος στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας σε γυναίκες με προχωρημένο στάδιο καρκίνου του μαστού. Υψηλά επίπεδα σε CA15-3 σχετίζονται επίσης με καρκίνους των ωοθηκών, του πνεύμονα και του προστάτη, όπως επίσης και με μη καρκινικές καταστάσεις όπως καλοήθειες παθήσεις του μαστού και των ωοθηκών, ενδομητρίωση, πυελική φλεγμονή και ηπατίτιδα. Η εγγυμοσύνη και ο θηλασμός μπορούν επίσης να αυξήσουν τα επίπεδα του CA 15-3.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η DIAsource CA 15-3-IRMA είναι μια ανοσοραδιομετρική εξέταση δύο βημάτων που βασίζεται στο διαχωρισμό σε επιστρωμένο σωληνάριο. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Προσθέστε του βαθμονομητές ή τα δείγματα στα σωληνάρια. Έπειτα από την επώαση, η πλύση αποβάλλει την πιθανή περίσσεια αντιγόνου. Προσθήκη Mab2, του αντισώματος σηματοδότησης που είναι σημασμένο με ¹²⁵I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Σωληνάρια επιστρωμένα με anti CA 15-3 (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	ελεφαντόδοντο	Έτοιμο για χρήση
 ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-CA 15-3 (μονοκλωνικά αντισώματα) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόειο ορό, αζίδιο (<0,1%) και μια αδρανής κόκκινη χρωστική	1 φιαλίδιο 6,0 ml 870 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
 Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόειο ορό αλβουμίνη και θυμόλη (<0,1%) Οι βαθμονομητές έχουν προηγουμένως αραιωθεί	5 φιαλίδια λυοφιλόπο ημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης
 Ρυθμιστικό αραιώσης: σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόειο ορό και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 26 ml	Μαύρο	Έτοιμο για χρήση
 Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	2 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλόπο ημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 200 μl και 500 μl (συνιστάται η χρήση πιπέτων ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Πλαστικά σωληνάρια για την αραιώση των δειγμάτων
4. Αναμεικτής στροβιλισμού
5. Μαγνητικός αναδευτήρας
6. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
7. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
8. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
9. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Πραγματοποιήστε την ανασύσταση των βαθμονομητών με 0.5ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης.
- B. Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά από την ανασύσταση, ψύξτε αμέσως σε κλάσματα και διατηρείστε σε -20°C για 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάμυξης-απόμυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- B. Διαδικασία**
 1. Τοποθετήστε μια ετικέτα στο σκέτο πλαστικό σωληνάριο για κάθε δείγμα και ορό ελέγχου.
 2. Διανεύστε 500 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Αραιώσης σε κάθε σωληνάριο.
 3. Προσθέστε 20 μl δείγματος και ορών ελέγχου σε αυτά τα σωληνάρια.
 4. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
 5. Αναδεύστε σύντομα τους βαθμονομητές, τα προαραιωμένα δείγματα και τους ορούς ελέγχου και διανεύστε 50 μl από το καθένα στα αντίστοιχα σωληνάρια.
 6. Επώαση επί 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
 7. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 8. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 9. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).

10. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
11. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
12. Διανείμετε 50 μl ιχνηθέτη σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανόμενα τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη 1251 ("total").
13. Εποάστε επί 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
14. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
15. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
16. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
17. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
18. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
19. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημίλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της CA 15-3 (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

CA 15-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Συνολική μέτρηση		258080	100
Βαθμονομητής	0,0 U/ml	415	0,16
	2,86 U/ml	2440	0,95
	9,10 U/ml	6957	2,70
	28,30 U/ml	18367	7,12
	104,00 U/ml	48032	18,61
	331,00 U/ml	89798	34,79

Δεδομένου του ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο υλικό διεθνούς αναφοράς για το αντιγόνο CA 15-3, οι τιμές των βαθμονομητών BSE CA 15-3-IRMA προσδιορίζονται έναντι ενός εσωτερικού σετ προτύπων αναφοράς.

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δόση, ήταν 0,33 U/ml.

B. Ειδικότητα

Η εξέταση BSE CA 15-3 IRMA βασίζεται σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, το προσελκύν MAb Ma695 που στοχεύει ένα σιελοποιημένο υδατανθρακικό επίτοπο και το ανιχνεύον MAb Ma 552 που στοχεύει το υδρόφιλο πεπτιδίο PDTRAPG του πρωτεϊνικού πυρήνα.

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (U/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (U/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	14,2 ± 0,4	2,7	A	20	12,8 ± 0,8	6,4
B	20	94,1 ± 2,8	3,0	B	20	86,9 ± ,5,4	6,2

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Προσθεθείσα CA 15-3 (U/ml)	Ανακτηθείσα CA 15-3 (U/ml)	Ανάκτηση (%)
21,80	20,48	93,9
43,75	43,34	99,1
80,91	81,59	100,8
169,92	164,18	96,6
307,87	299,60	97,3

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (U/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (U/ml)
A	1/1	-	184,61
	1/2	92,31	91,79
	1/4	46,15	46,70
	1/8	23,08	22,33
	1/16	11,54	11,34
	1/32	5,77	5,61

Τα δείγματα αραιώθηκαν με Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης.

Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	11,4	11,4	11,4	11,2
S 2 (U/ml)	187,7	183,3	187,2	187,2

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγματα που περιέχουν 100.000 U/ml CA 15-3 δίνουν ένα αποτέλεσμα υψηλότερο από το τελευταίο σημείο βαθμονόμησης.

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντι-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές

τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XVI. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μεταξύ 232 φανερά υγιών ατόμων, 99% των αποτελεσμάτων ήταν κάτω των 30,0 U/ml.

Για διαγνωστικούς σκοπούς, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από αυτόν τον προσδιορισμό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα σε συνδυασμό με την κλινική εξέταση, το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και άλλα ευρήματα.

XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυναμικά μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. GENDLER SJ, SPICER AP.+
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
2. KUFU D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
3. DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
4. COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
5. SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
6. CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
7. MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.
8. GION M, PELOSO L, et al.
Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up time.
Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (ml)	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ (ml)	Αραιωμένα Δείγματα, Οροί ελέγχου (ml)
Βαθμονομητές (0-5) Αραιωμένα Δείγματα, Οροί ελέγχου	- -	0,05 -	- 0,05
Επώαση	90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Ιχνηθέτης	0,05	0,05	0,05
Επώαση	90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP0321	Αριθμός P.I.: 1700864/eI	Αρ. αναθεώρησης: 110218/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2011-02-18



Прочетете целия протокол преди употреба

CA 15-3-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имунорадиометричен набор за количествено определяне in vitro на туморния маркер MUC-1 (CA 15-3) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource CA 15-3-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP0321: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.90

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

Карциномният антиген CA 15-3 представлява муцинов глюкопротеин с високо молекулно тегло, означаван като MUC-1. Той се характеризира на базата на моноклонални антитела, които се образуват при наличието на пречистени екстракти от мембранни фракции, изолирани от човешки карцином на гърдата (клонинг DF3), и при наличието на мембрани от мастни телца в човешка тъкан от млечна жлеза (клонинг 115D8).

Други названия на муцина включват полиморфен епителен муцин (PEM), епителен мембранен антиген (MEA) или епизалин.

B. Клинични приложения

Този маркер е най-полезен при оценката на ефекта от лечение при жени с напреднал карцином на млечната жлеза. Повишените нива на CA15-3 се свързват и с карциноми на яйчниците, белите дробове и простатата, както и с доброкачествени гърда или яйчници, ендометриоза, възпаление на тазовите органи и хепатит. Нивата на CA 15-3 могат да се повишат и по време на бременност и кърмене.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIASource CA 15-3-IRMA представлява двуетапна имунорадиометрично изследване, базирано на сепарация на покрити епруветки. Mab1, прихващащото анти тяло, се прикрепва към долната и вътрешната повърхност на пластмасова епруветка. Към нея се добавят калибратори или проби. След период на инкубация чрез измиване се отстранява случайния излишък на антигена. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антители, маркирани с ^{125}I , завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Кит за анализ ⁹⁶	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-CA 15-3 (моноклонални антители)	2 x 48	Слонова кост	Готов за употреба
Ab ^{125}I Анти-CA 15-3- ^{125}I (моноклонални антители) във фосфатен буфер с волски серум, натриев азид (<0.1%) и инертна червена боя	1 флакон 6,0 ml 870 kBq	червен	Готов за употреба
CAL N Калибратори 1-5 във фосфатен буфер с волски серумен албумин и тимол (<0.1%). Видж точните стойности на етикетите на флаконите. Калибраторите са предварително разредени	5 флакона лиофилизирани	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода
DIL BUF Буфер за разреждане: фосфатен буфер с волски серум и азиди (<0.1%)	1 флакон 26 ml	черен	Готов за употреба
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (TRIS-HCl)	2 флакона 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешки серум с тимол	2 флакона лиофилизирани	сребърен	Добавете 0,5 ml дестилирана вода

Забележка: За нулев калибратор използвайте буфера за разреждане.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 50 μl , 200 μl и 500 μl (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
3. Пластмасови епруветки за разреждане на пробите.
4. Завихрящ смесител
5. Клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута)
6. Магнитен сепаратор
7. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
8. Аспирационна система (по избор).
9. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте калибраторите с 0,5ml буфер за разреждане.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 0,5 ml дестилирана вода.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- Калибраторите и контролите са твърде нестабилни, използвайте ги непосредствено след реконституирането, замразете ги веднага в аликвоти и ги съхранявайте при -20°C в продължение на 3 месеца.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Пряко приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът и плазмата трябва да се съхраняват при температури 2 – 8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклачане или въртливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

1. Залепете етикет на пластмасовите епруветки за всяка проба и контрола.
2. Разпределете 500 μl буфер за разреждане във всяка епруветка.
3. Добавете 20 μl проба и контроли в тези епруветки.
4. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
5. Смесете за кратко чрез въртливо размесване калибраторите, предварително разредените проби и контролите и разпределете по 50 μl от всяко в съответните епруветки.
6. Инкубирайте за 90 минути при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
7. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
8. Изплакнете епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
9. Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
10. Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
11. Разпределете 50 μl от анти-CA 15-3- ^{125}I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
12. Инкубирайте за 90 минути при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
13. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
14. Изплакнете епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
15. Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).

16. Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
17. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
- На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минутата за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на СА 15-3 и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
- Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
- Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

СА 15-3-IRMA		срм	В/Т (%)
Общ брой		258080	100
Калибратор	0,0 U/ml	415	0,16
	2,86 U/ml	2440	0,95
	9,10 U/ml	6957	2,70
	28,30 U/ml	18367	7,12
	104,00 U/ml	48032	18,61
	331,00 U/ml	89798	34,79

Тъй като за туморния маркер СА 15-3 няма наличен международен референтен материал, то стойностите на калибратора DIAsource CA 15-3-IRMA се определят на базата на редица вътрешни референтни стандарти.

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Дванадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0,33 U/ml.

B. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	<X>±S.D. U/ml	CV (%)	Серум	N	<X>±S.D. U/ml	CV (%)
A	20	14,2 ± 0,4	2,7	A	20	12,8 ± 0,8	6,4
B	20	94,1 ± 2,8	3,0	B	20	86,9 ± 5,4	6,2

C. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (U/ml)	Измерена концентрация (U/ml)
A	1/1	-	184,61
	1/2	92,31	91,79
	1/4	46,15	46,70
	1/8	23,08	22,33
	1/16	11,54	11,34
	1/32	5,77	5,61

Пробите са предварително разредени с буфер за разреждане.

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Добавен СА 15-3 (U/ml)	Възстановен СА 15-3 (U/ml)	Възстановяване (%)
21,80	20,48	93,9
43,75	43,34	99,1
80,91	81,59	100,8
169,92	164,18	96,6
307,87	299,60	97,3

D. Закъснение между разпределянето на последния калибратор и пробите

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

ЗАКЪСНЕНИЕ

	0'	10'	20'	30'
C 1 (U/ml)	11,4	11,4	11,4	11,2
C 2 (U/ml)	187,7	183,3	187,2	187,2

E. Ефект на кукичката

Пробите, съдържащи 100,000 U/ml СА15-3 дават резултат, по-висок от последната калибрационна стойност.

F. Специфичност

DIAsource CA 15-3 IRMA е базиран на две моноклонални антитела на мишки, улавящи MAb Ma695, прицелен към сиалилиран въглеродороден епитоп и разпознаващия MAb Ma 552, прицелен към PDTRAPG хидрофилния пептид на протеинното ядро.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (НАМА). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела. Хетерофилните антитела в човешкия серум могат да реагират с реагентните имуноглобулини, смущавайки *in vitro* имунотестовите. Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофилни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела. Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изисква допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XVI. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

99% от резултатите на 232 очевидно здрави индивида бяха под 30,0 U/ml. За диагностични цели резултатите, получавани на базата на това изследване трябва винаги да се използват в комбинация с клинични изследвания, медицинската история на пациента и други находки.

XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на

радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пилетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

- GENDLER SJ, SPICER AP.+
Epithelial mucin genes.
Ann Rev Physiol 1995;57:112-120.
- KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, et al.
Differential reactivity of a novel monoclonal antibody with human malignant versus benign breast tumors.
Hybridoma 1984;3:223-232.
- DUFFY MJ
CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer.
Ann Clin Biochem 1999;36:579-586.
- COVENEY EC, GERAGHTY JG, et al.
The clinical value of CEA and CA 15-3 I breast cancer management.
Int J Biol Markers 1995;10:35-41.
- SOLETORMOS G, NIELSEN D, et al.
CA 15-3, CEA and TPA for monitoring metastatic breast cancer during first line chemotherapy and follow-up.
Clin Chem 1996;42:564-575.
- CHEUNG K, GRAVES CR, et al.
Tumor marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.
Cancer Treat Rev 2000;26:91-102.
- MOLINA R, DUFFY MJ, et al.
Tumor markers in breast cancer : EGTM Recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2803-2805.
- GION M, PELOSO L, et al.
Tumor markers in breast cancer monitoring should be scheduled according to initial stage and follow-up time.
Cancer J 2001;7:181-190.

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ µl	КАЛИБРАТОРИ µl	Разредени ПРОБА (II) КОНТРОЛИ µl
Калибратори (0-5) Разредени проби, контроли	- -	50 -	- 50
Инкубация	90 минути при стайна температура с разклащане 400 оборота в минута		
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Трейсьър	50	50	50
Инкубация	90 минути при стайна температура с разклащане 400 оборота в минута		
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		

DIAsource каталог номер: KIP0321	P.I. номер: 1700864/bu	Номер на ревизия: 110218/1
-------------------------------------	---------------------------	-------------------------------

Дата на ревизия: 2011-02-18

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 1251	Tracer
Ab 1251	Tracer
Ag 1251 CONC	Tracer concentrated
Ab 1251 CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
U U	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
TLT	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación

	<u>Simboli utilizzati</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluyente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluyente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Poli(etil)englicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
TUT	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
I V D	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιζηθέτης
Ab 125I	Ιζηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
	Σωληνάριο
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOABSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασυστασης
PEG	Πολυ(εθιλενογλυκόλη)
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλυσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
μπ	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
I V D	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
ULF	Микротигърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично анти тяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ анти тяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер