

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



CA72-4 ELISA



DE5071



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENUTI / CONTENIDO / CONTENU

1	INTRODUCTION	4
2	PRINCIPLE OF THE TEST*	4
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
4	REAGENTS	6
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	7
6	ASSAY PROCEDURE	8
7	EXPECTED NORMAL VALUES	9
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	10
10	LIMITATIONS OF USE	11
11	LEGAL ASPECTS	11
12	REFERENCES / LITERATURE	12
1	EINLEITUNG	13
2	TESTPRINZIP*	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	14
5	PROBENVORBEREITUNG	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG	16
7	ERWARTETE WERTE	17
8	QUALITÄTS-KONTROLLE	17
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	18
10	GRENZEN DES TESTS	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	19
12	REFERENZEN / LITERATUR	19
1	INTRODUZIONE	20
2	PRINCIPIO DEL TEST*	20
3	PRECAUZIONI	20
4	COMPONENTI DEL KIT	21
5	CAMPIONI	22
6	ATTUAZIONE DEL TEST	23
7	VALORI NORMALI	24
8	CONTROLLO QUALITÀ	24
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	24
10	LIMITAZIONE DEL TEST	25
11	ASPETTI LEGALI	26
12	BIBLIOGRAFIA	26
1	INTRODUCCIÓN	27
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO*	27
3	PRECAUCIONES	27
4	COMPONENTES DEL KIT	28
5	MUESTRAS	29
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	30
7	VALORES ESPERADOS	31
8	CONTROL DE CALIDAD	31
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	31
10	LIMITACIONES DE USO	31
11	ASPECTOS LEGALES	33
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	33

1	INTRODUCTION	34
2	PRINCIPE DU TEST*	34
3	PRECAUTIONS D'UTILISATION	34
4	COMPOSITION DU KIT	35
5	ECHANTILLON.....	36
6	RÉALISATION DU TEST	37
7	VALEURS ATTENDUES	38
8	CONTRÔLE DE QUALITÉ	38
9	CARACTERISTIQUES DU TEST	38
10	LIMITES D'UTILISATION	39
11	ASPECTS LEGAUX.....	40
12	REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE	40
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	40

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC CA72-4 ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of CA 72-4 (TAG-72) in serum and plasma.

1.2 Summary and Explanation

CA 72-4 (Cancer antigen 72-4) was originally described as an antigenic determinant recognized by B 72.3, a murine monoclonal antibody raised against a membrane extract of mammary carcinoma metastases (1). CA 72-4 was identified as a 1 MDa mucine-like Glycoprotein complex termed TAG-72 (tumor associated antigen 72) (2). The molecular weight of the TAG-72 protein is 48 kD. Elevated CA 72-4 levels in serum and plasma have been reported in various malignant diseases including carcinomas of pancreas, stomach, gall, colon, breast, ovaries, cervix and endometrium (3). The highest diagnostic sensitivities are found for carcinomas of the gastrointestinal tract and ovaries. Although some benign diseases such as rheumatic diseases or ovary cysts may also result in elevated levels of CA 72-4, clinical studies demonstrated diagnostic specificities of more than 95% for gastrointestinal and ovarian malignancies (4). There is a good correlation between CA 72-4 levels and tumor stage and size (3). CA 72-4 is the marker of choice for the therapeutic monitoring and follow-up care of gastrointestinal cancer patients. Suitable second markers are CA 19-9 or CEA. Additionally, CA 72-4 has been used as an independent marker for the therapeutic monitoring and follow-up care of ovarian cancer patients, in particular in CA 125 negative patients (3, 5).

2 PRINCIPLE OF THE TEST*

The DEMEDITEC CA72-4 ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal mouse antibody (Clone CC49) directed towards a unique antigenic site on a CA 72-4 molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous CA 72-4 is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-CA 72-4 antibody (Clone B72.3) conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of CA 72-4 in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of CA 72-4 in the patient sample.

* The antibodies used in this assay are patented by:

1. U.S. Patent No. 5,512,443, issued April 4, 1996 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (**HHS Reference No. E-160-1987/0-US-18**)
2. Canadian Patent No. 1339980, issued August 4, 1998 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (**HHS Reference No. E-160-1987/0-CA-04**)
3. U.S. Patent No. 4,522,918, issued June 11, 1985 (now expired) entitled "Process for Producing Monoclonal Antibodies Reactive with Human Breast Cancer" (**HHS Reference No. E-185-1981/0-US-01**)

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 1 N acidic solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT** Microtiterwells, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-CA 72-4 antibody (monoclonal).
2. **CAL 0 – 4** Standard (Standard 0-4), 5 vials, 0.5 mL, ready to use. Concentration: 0, 3, 20, 50, 100 U/mL
Contain non-mercury preservative.
3. **CONTROL low & high LYQ** Control Low & High, 2 vials, (lyophilized) 0.5 mL each, see „Reagent Preparation“. Control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. Contains non-mercury preservative.
4. **SAM DIL** Sample Diluent, 1 vial, 3 mL, ready to use, Contains non-mercury preservative.
5. **ENZ CONJ 10x** Enzyme Conjugate 10X concentrate, 1 vial, 1.4 mL, anti-CA 72-4 antibody conjugated to horseradish peroxidase; see „Reagent Preparation“ Contains non-mercury preservative.
6. **ENZ CONJ DIL** Conjugate Diluent, 1 vial, 14 mL, ready to use. Contains non-mercury preservative.
7. **SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 1 N acidic solution, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **WASH SOLN 40x** Wash Solution, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional Sample Diluent for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2-8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8 °C. Microtiter wells must be stored at 2-8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Control

Reconstitute the lyophilized content with 0.5 mL distilled water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the controls several times before use. **Note:** The reconstituted controls should be apportioned and stored at -20 °C.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL. *The diluted Wash Solution is stable for 1 week at room temperature (20 °C to 26 °C).*

Enzyme Conjugate

Dilute *Enzyme Conjugate* concentrate 1:10 in *Conjugate Diluent*. Stability of the prepared *Enzyme-Conjugate*: 1 week at 2 °C to 8 °C in a sealed container.

Example:

If the whole plate is used, dilute 1.2 mL *Enzyme Conjugate* with 10.8 mL *Conjugate Diluent* to a total volume of 12 mL. If the whole plate is not used at once prepare the required quantity of *Enzyme Conjugate* by mixing 100 µL of *Enzyme Conjugate 10X conc.* with 0.9 mL of *Conjugate Diluent* per strip (see table below):

No. of strips	<i>Enzyme Conjugate 10X conc.</i> (µL)	<i>Conjugate Diluent</i> (mL)
1	100	0.9
2	200	1.8
3	300	2.7
4	400	3.6
5	500	4.5
6	600	5.4
7	700	6.3
8	800	7.2
9	900	8.1
10	1000	9.0
11	1100	9.9
12	1200	10.8

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheets (see chapter 13).

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, Heparin- or citrate plasma) can be used in this assay. Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. *Please note:* Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection**Serum:**

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Sample Diluent* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 μ L sample + 90 μ L *Sample Diluent* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 μ L dilution a) 1:10 + 90 μ L *Sample Diluent* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Pipette **20 μ L** of each *Standard*, *Control* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Add **100 μ L** freshly diluted *Enzyme Conjugate* (see "Reagent Preparation") into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **120 minutes** at room temperature.
5. Wash the wells as follows:
If the wash step is performed manually:
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with **300 μ L** diluted *Wash Solution* per well.
If an automated plate washer is used:
Rinse the wells **5 times** with **400 μ L** diluted *Wash Solution* per well
At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplet.
6. Add **100 μ L** of *Substrate Solution* to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 μ L** of *Stop Solution* to each well.
9. Measure the optical density of the solution in each well at 450 nm filter (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended).
It is recommended that the wells be read within 10 minutes after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Manual method: Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.)
Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 100 U/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 U/mL)	0.08
Standard 1 (3 U/mL)	0.19
Standard 2 (20 U/mL)	0.59
Standard 3 (50 U/mL)	1.16
Standard 4 (100 U/mL)	2.02

7 EXPECTED NORMAL VALUES

The reference values of the CA72-4 ELISA for healthy individuals were determined by measuring the values of apparently healthy subjects. 121 male and 119 female samples were measured. q-q plot (quantil-quantil plot) was performed in order to test normal distribution of values and give the chance to identify and exclude potentially false healthy subjects. Final calculation of 2.5th to 97.5th percentile was done with a data set which was cleared by q-q-plot analysis. It is strongly recommended, that each laboratory should determine its own reference values.

	Male	Female	Total
Number	121	119	240
97.5th Percentile U/mL	3.84	6.56	5.55
2.5th Percentile U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
MEAN U/mL	0.72	0.99	0.86
MEDIAN U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Min Value U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Max Value U/mL	30.51	26.78	30.51

The results are in good agreement with published cut-offs between 4 U/mL - 6 U/mL (Reference/Literature 3-6).

The normal range was established and corresponds well to data obtained from the literature. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.60 U/mL – 100 U/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

No cross reactivity was observed with related proteins.

9.3 Sensitivity (LoB, LoD, LoQ)

The Limit of Blank (LoB) is 0.44 U/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 0.60 U/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 0.82 U/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)	Status
Sample 1	40	3.79	4.7	passed
Sample 2	40	6.35	3.7	passed
Sample 3	40	15.89	3.0	passed
Sample 4	40	63.44	4.1	passed

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)	Status
Sample 1	80	3.79	10.1	passed
Sample 2	80	6.35	8.4	passed
Sample 3	80	15.89	6.1	passed
Sample 4	80	63.44	6.0	passed

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding CA 72-4 solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The expected values were calculated by addition of half of the values determined for the undiluted samples and half of the values of the known solutions. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [U/mL]	3.6	8.1	9.4
Average Recovery [%]	99.3	98.2	98.8
Range of Recovery [%]	from	92.5	88.2
	to	102.1	106.8

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [U/mL]	51.0	94.0	10.0
Average Recovery [%]	91.2	108.5	97.8
Range of Recovery [%]	from	106.4	86.0
	to	99.6	112.0

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results. Triglycerides > 7.5 mg/mL will result in decreased values. The assay contains reagents to minimize interference of HAMA and heterophilic antibodies. However, extremely high titers of HAMA or heterophilic antibodies may interfere with the test results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of CA 72-4 in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

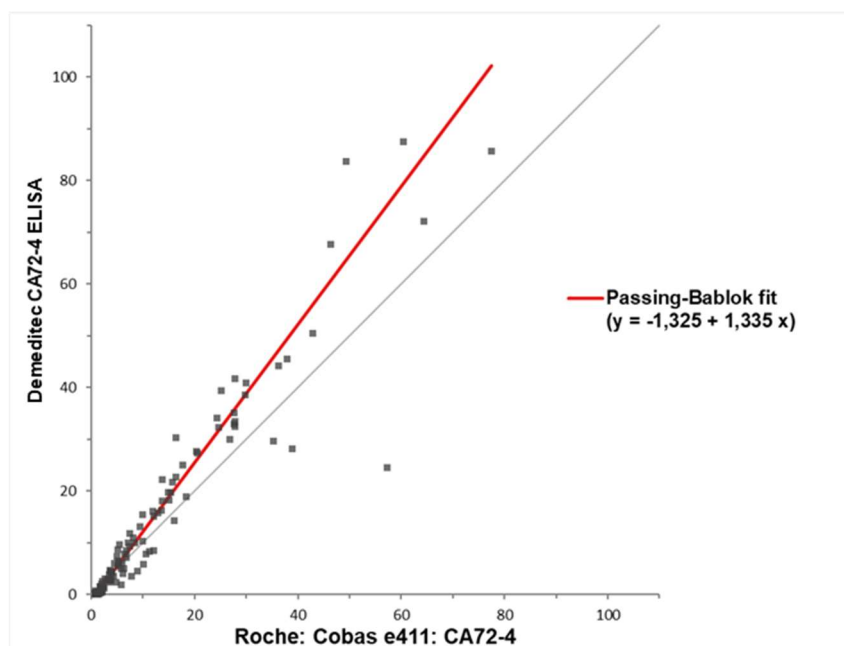
No hook effect was observed in this test up to 6,400 U/mL of CA 72-4.

10.4 Method comparison

A comparison of Demeditec CA72-4 ELISA DE5071 (y) and reference method (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$n = 130$$

$$r = 0.95$$



The Demeditec ELISA data perfectly correlate with the data of the reference method.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Colcher D., Horand Hand P., Nuti M., Schlom J. A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981, 78:3199- 3208.
2. Johnson VG, Schlom J., Paterson AJ, Bennett J, Magnani JL, Colcher D. Analysis of a human tumor associated glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody 72.3. *Cancer Res.* 1986; 46: 850-857.
3. Lamerz R. in Thomas L. (editor) *Labor und Diagnose* 6. edition, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main 2005, 1310-13..
4. Guadagni F., Roselli M., Cosimelli M., Ferroni P., Spila A., Cavaliere F., Casaldi V., Wappner G., Abbolito M.R., Greiner J.W., Schlom J. CA 72-4 serum marker – a new tool in the management of carcinoma patients. *Cancer Invest.* 1995; 13(2): 227 – 238.
5. Hasholzner U., Baumgartner L., Stieber P., Meier W., Hofmann K. Fateh-Moghadam A. Significance of the tumour markers CA 125 II, CA 72-4, CASA and CYFRA 21-1 in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 1994 Nov-Dec; 14 (6B):2743-6.
6. Marrelli D., Pinto E., De Stefano A., Farnetani M., Garosi L., Roviello F. Clinical utility of CEA, CA 19-9, and CA 72-4 in the follow-up of patients with resectable gastric cancer. *Am J Surg.* 2001, 181(1):16-9.

1 EINLEITUNG

Der **DEMEDITEC CA72-4 ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von CA 72-4 in Serum und Plasma eingesetzt. **Nur für In-vitro Diagnostik.**

2 TESTPRINZIP*

Der DEMEDITEC CA72-4 ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper (Clone CC49) beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des CA 72-4-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen monoklonalen anti-CA 72-4-Antikörper (Clone B72.3), der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der CA 72-4-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

* Die in diesem Assay eingesetzten Antikörper sind durch folgende Patente geschützt:

1. U.S. Patent No. 5,512,443, issued April 4, 1996 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-US-18)
2. Canadian Patent No. 1339980, issued August 4, 1998 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-CA-04)
3. U.S. Patent No. 4,522,918, issued June 11, 1985 (now expired) entitled "Process for Producing Monoclonal Antibodies Reactive with Human Breast Cancer" (HHS Reference No. E-185-1981/0-US-01)

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 1 N saure Lösung enthält. Saure Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß den Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit anti- CA 72-4 -Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 – 4 Standard (Standard 0-4)**, 5 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0; 3, 20, 50, 100 U/mL. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen (lyophilisiert), je 0,5 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **SAM DIL Sample Diluent** (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **ENZ CONJ 10x Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) **10X konzentriert**, 1 Fläschchen, 1,4 mL; Anti- CA 72-4 -Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert, siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **ENZ CONJ DIL Conjugate Diluent** (Konjugatverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 1 N saure Lösung, Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzliches Sample Diluent zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Control

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Fläschchen mit 0,5 mL destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch die Kontrollen mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Die rekonstituierten Kontrollen müssen portioniert und bei -20 °C eingefroren werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (20°C bis 26 °C) für 1 Woche stabil.*

Enzyme Conjugate

Verdünnen Sie das *Enzymkonjugat*-Konzentrat 1:10 mit *Conjugate Diluent*. Stabilität der Enzymkonjugat-Arbeitslösung: 1 Woche bei 2 °C - 8 °C in einem verschlossenen Behälter.

Beispiel:

Wird die ganze Platte verwendet, verdünnen Sie 1,2 mL *Enzyme Conjugate* mit 10,8 mL *Conjugate Diluent* (Gesamtvolumen 12 mL). Wird nur ein Teil der Platte benötigt, setzen Sie nur das erforderliche Volumen des Konjugates an. Verdünnen Sie dafür pro Streifen 100 µL *Enzyme Conjugate*-Konzentrat mit 0,9 mL *Conjugate Diluent* (siehe Tabelle):

Anzahl der Streifen	<i>Enzyme Conjugate 10X konz.</i> (µL)	<i>Conjugate Diluent</i> (mL)
1	100	0,9
2	200	1,8
3	300	2,7
4	400	3,6
5	500	4,5
6	600	5,4
7	700	6,3
8	800	7,2
9	900	8,1
10	1000	9,0
11	1100	9,9
12	1200	10,8

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Citratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Sample Diluent* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Sample Diluent* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden. Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen. Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 20 µL Standards, Control** und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL frisch angesetztes Enzyme-Conjugate** (siehe „Vorbereitung der Reagenzien“) in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5-mal mit verdünnter *Wash Solution* (400 µL/Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen. **Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrutes!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 U/mL)	0,05
Standard 1 (3 U/mL)	0,14
Standard 2 (20 U/mL)	0,65
Standard 3 (50 U/mL)	1,25
Standard 4 (100 U/mL)	2,04

7 ERWARTETE WERTE

Die Referenzwerte des CA72-4 ELISA für gesunde Personen wurden durch Messung der Werte von scheinbar gesunden Probanden ermittelt. Es wurden 121 männliche und 119 weibliche Proben gemessen. Es wurde ein q-q-Plot (Quantil-Quantil-Plot) erstellt, um die Normalverteilung der Werte zu prüfen und die Möglichkeit zu bieten, potenziell falsche gesunde Probanden zu identifizieren und auszuschließen. Die endgültige Berechnung des 2,5. bis 97,5. Perzentils wurde mit einem Datensatz durchgeführt, der durch die q-q-Plot-Analyse bereinigt wurde.

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte festlegt.

	Männlich	Weiblich	Gesamt
Anzahl	121	119	240
97.5 Perzentile U/mL	3.84	6.56	5.55
2.5 Perzentile U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
MEAN U/mL	0.72	0.99	0.86
MEDIAN U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Minimalwert U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Maximalwert U/mL	30.51	26.78	30.51

Die Ergebnisse stimmen gut mit Literaturangaben zum Grenzwertbereich (cut-off) für gesunde Personen von 4 U/mL – 6 U/mL überein (Reference/Literature 3-6).

Der Normalbereich wurde festgelegt und stimmt gut mit den Daten aus der Literatur überein. Die Ergebnisse allein sollten nicht der einzige Grund für etwaige therapeutische Konsequenzen sein. Die Ergebnisse sollten mit anderen klinischen Beobachtungen und diagnostischen Tests korreliert werden.

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,60 – 100 U/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Analytische Sensitivität (LoB, LoD, LoQ)

Die Blindwertgrenze (LoB) beträgt 0,44 U/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) liegt bei 0,60 U/mL.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) liegt bei 0,82 U/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 7,5 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Triglyceride > 7.5 mg/mL führen zu erniedrigten Werten.

Der Test enthält Reagenzien, um Interferenzen mit HAMA oder heterophilen Antikörpern zu minimieren. Dennoch ist es möglich, dass ein sehr hoher Titer von HAMA oder heterophilen Antikörpern das Testergebnis beeinflusst.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des CA 72-4-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

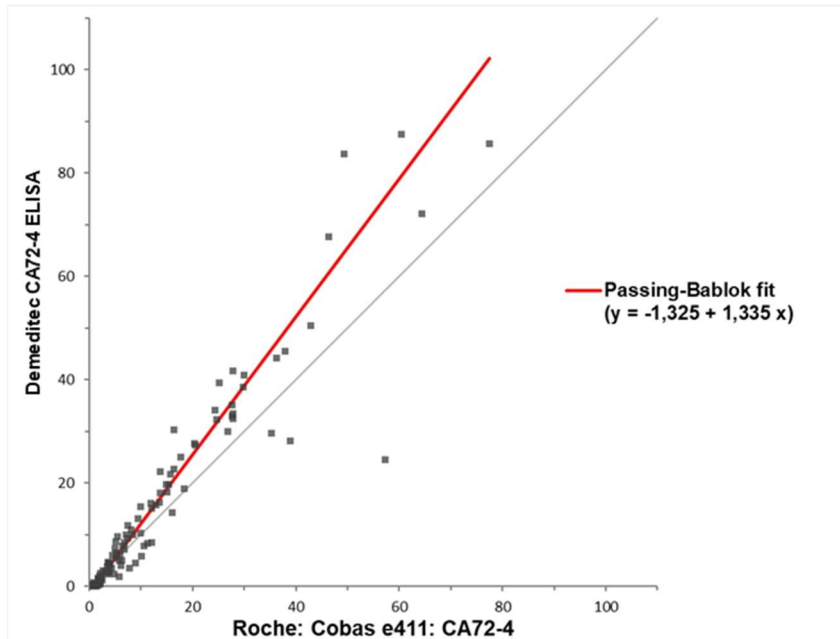
Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 6.400 U/mL CA 72-4 nicht auf.

10.4 Methodenvergleich

Ein Vergleich des Demeditec CA72-4 ELISA DE5071 (y) mit der Referenzmethode (x) anhand klinischer Proben ergab folgende Korrelation:

n = 130

r = 0.95



Die Daten des Demeditec-ELISA korrelieren perfekt mit den Daten der Referenzmethode

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC CA72-4 ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di CA 72-4 (TAG-72) in siero e plasma. **Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

2 PRINCIPIO DEL TEST*

Il test kit DEMEDIATEC CA72-4 ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich. I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale (Clone CC49) diretto contro un unico sito antigenico su una molecola CA 72-4. Un'aliquota di un campione di paziente contenente CA 72-4 endogeno/a viene incubato nel pozzetto ricoperto dell'enzima coniugato, che è un anticorpo anti- CA 72-4 (Clone B72.3) coniugato alla perossidasi di rafano. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è eliminato attraverso lavaggi. La quantità della perossidasi legata è proporzionale alla concentrazione CA 72-4 nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di CA 72-4 nel campione del paziente.

* Anticorpi utilizzati in questo test sono protetti da brevetti:

1. U.S. Patent No. 5,512,443, issued April 4, 1996 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-US-18)
2. Canadian Patent No. 1339980, issued August 4, 1998 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-CA-04)
3. U.S. Patent No. 4,522,918, issued June 11, 1985 (now expired) entitled "Process for Producing Monoclonal Antibodies Reactive with Human Breast Cancer" (HHS Reference No. E-185-1981/0-US-01)

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 1 N acido soluzione. L'acido soluzione può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-CA 72-4 anticorpo (monoclonale).
2. **CAL 0 - 4 Standard (Standard 0-4)**, 5 fialoni, 0,5 mL; pronto all'uso. Concentrazione: 0; 3, 20, 50, 100 U/mL. Contiene conservante senza mercurio.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High** (Controllo), 2 fialoni (liofilizzato), 0,5 mL. vedi „preparazione dei reagenti“. I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei fialoni o sulla descrizione QC. Contiene conservante senza mercurio.
4. **SAM DIL Sample Diluent** (Diluente dei campioni), 1 fialone, 3 mL, pronto all'uso. Contiene conservante senza mercurio.
5. **ENZ CONJ 10x Enzyme Conjugate Concentrate 10X** (tracciante enzimatico concentrato 10X), 1 fialone, 1,4 mL, anti- CA 72-4 anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano. vedi „preparazione dei reagenti“. Contiene conservante senza mercurio.
6. **ENZ CONJ DIL Conjugate Diluent** (Diluente del tracciante), 1 fialone, 14 mL, pronto all'uso. Contiene conservante senza mercurio.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 fialone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 fialone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 1 N acido soluzione. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 fialone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

Nota: Ulteriore Sample Diluent può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 - 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data. Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente. Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Control

Ricostituire il contenuto liofilizzato con 0,5 mL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti. Mescolare alcune volte prima dell'uso. **Nota:** I controlli ricostituiti dovrebbe essere aliquotati e magazzinati a -20 °C.

Wash Solution

Diluire 30 mL della soluzione di lavaggio concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Enzyme Conjugate

Diluire il tracciante enzimatico concentrato 1:10 con il diluente del tracciante.

Stabilità del tracciante enzimatico diluito: 1 settimana a 2 °C - 8 °C in un contenitore chiuso.

Esempio:

Se la piastra intera è usata, diluire 1.2 mL *Enzyme Coniugate* con 10.8 mL del *Conjugate Diluent* per avere un volume totale di 12 mL. Se non viene usata una piastra intera preparare la quantità del tracciante necessaria mescolando 100 µL del *Enzyme Coniugate 10X* con 0.9 mL del *Conjugate Diluent* per ogni fila di micropozzetti (vedi tabella):

No. di file	<i>Enzyme Coniugate 10X</i> conc. (µL)	<i>Conjugate Diluent</i> (mL)
1	100	0,9
2	200	1,8
3	300	2,7
4	400	3,6
5	500	4,5
6	600	5,4
7	700	6,3
8	800	7,2
9	900	8,1
10	1000	9,0
11	1100	9,9
12	1200	10,8

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, Eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test. Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici. Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni**Siero:**

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 - 8 °C. Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 12 mesi) dovrebbero essere congelati a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con *Sample Diluent* e nuovamente determinato. Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Sample Diluent* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Sample Diluent* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esegimento del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **20 µL** di ogni *Standard*, *Control* e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** (vedi "preparazione dei reagenti") in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti. Lavare i pozzetti 5 volte con *Wash Solution* diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esegimento del lavaggio!
6. Aggiungere **100 µL** della *Substrate Solution* ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della *Stop Solution* ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esegimento del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 U/mL)	0,05
Standard 1 (3 U/mL)	0,14
Standard 2 (20 U/mL)	0,65
Standard 3 (50 U/mL)	1,25
Standard 4 (100 U/mL)	2,04

7 VALORI NORMALI

I valori di riferimento del CA72-4 ELISA per gli individui sani sono stati determinati misurando i valori di soggetti apparentemente sani. Sono stati misurati 121 campioni di sesso maschile e 119 di sesso femminile. È stato eseguito un grafico q-q (grafico quantil-quantil) per verificare la distribuzione normale dei valori e dare la possibilità di identificare ed escludere soggetti sani potenzialmente falsi. Il calcolo finale del 2,5°-97,5° percentile è stato effettuato con un set di dati che è stato ripulito dall'analisi q-q-plot. Si raccomanda vivamente che ogni laboratorio determini i propri valori di riferimento.

	Maschio	Femmina	Totale
Mumero	121	119	240
97.5° Percentile U/mL	3.84	6.56	5.55
2.5° Percentile U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
MEDIA U/mL	0.72	0.99	0.86
MEDIANA U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Valore minimo U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Valore Massimo U/mL	30.51	26.78	30.51

I risultati si accordano con dati di valore soglia pubblicati (cut-off 4 U/mL - 6 U/mL) (Reference/Literature 3-6).

L'intervallo di normalità è stato stabilito e corrisponde bene ai dati ottenuti dalla letteratura. I risultati da soli non devono essere l'unica ragione per qualsiasi conseguenza terapeutica. I risultati devono essere correlati ad altre osservazioni cliniche ed esami diagnostici

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico. Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati. È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati. Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio. Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0.60 U/mL – 100 U/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

I sieri di individui sani non erano reattivi con il DEMEDITEC CA72-4 ELISA

9.3 Sensitività analitica (LoB, LoD, LoQ)

Il limite di bianco (LoB) è 0,44 U/mL.

Il limite di rilevazione (LoD) è 0,60 U/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è di 0,82 U/mL.

9.4 Precisione

9.5 Ritrovato

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare I risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 7.5 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

I risultati trigliceridi > 7.5 mg/mL sono diminuiti.

Il test contiene reagenti in grado di minimizzare l'interferenza di HAMA e di anticorpi eterofilici. Però livelli estremamente alti di HAMA o anticorpi eterofilici possono interferire con i risultati del test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di CA 72-4 nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

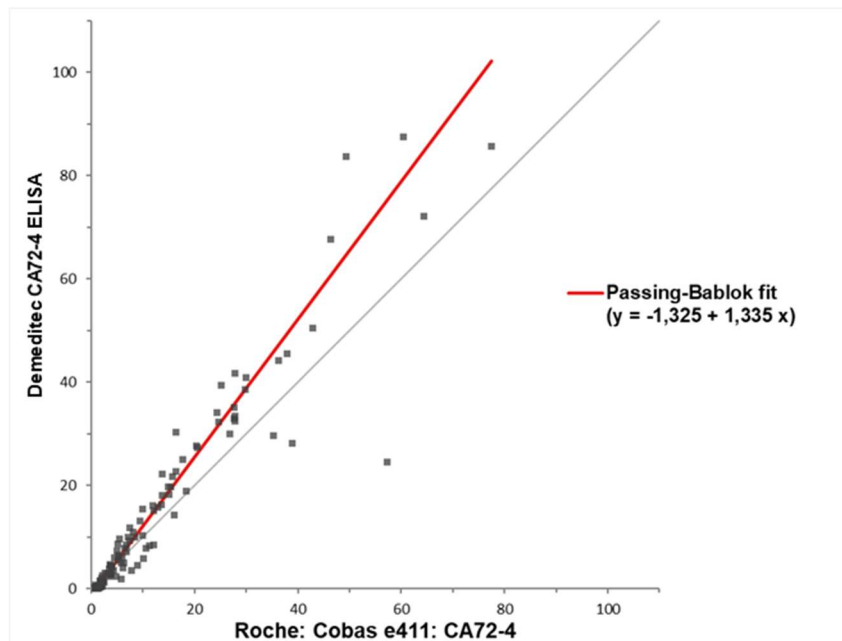
Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 6400 U/mL di CA 72-4.

10.4 Confronto tra i metodi

Un confronto tra il Demeditec CA72-4 ELISA DE5071 (y) e il metodo di riferimento (x) utilizzando campioni clinici ha fornito la seguente correlazione:

n = 130

r = 0.95



I dati del Demeditec ELISA sono perfettamente correlati con quelli del metodo di riferimento.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento. Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamo, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

El Kit de inmunoensayo enzimático CA 72-4 proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del CA 72-4 (TAG-72) en suero y plasma. Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO*

El Kit DEMEDITEC CA72-4 ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal (Clon CC49) dirigido contra un único foco antigénico en una molécula de CA 72-4. Se incubó una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene CA 72-4 endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti- CA 72-4 (Clon B72.3) conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido. La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de CA 72-4 en la muestra. Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de CA 72-4 en la muestra del paciente.

* Los anticuerpos utilizados en este ensayo están protegidos por patentes:

1. U.S. Patent No. 5,512,443, issued April 4, 1996 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-US-18)
2. Canadian Patent No. 1339980, issued August 4, 1998 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-CA-04)
3. U.S. Patent No. 4,522,918, issued June 11, 1985 (now expired) entitled "Process for Producing Monoclonal Antibodies Reactive with Human Breast Cancer" (HHS Reference No. E-185-1981/0-US-01)

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene 1 N solución ácida. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-CA 72-4 (monoclonal).
2. **CAL 0 - 4 Standard (Standard 0-4)**, (Estándar), 5 viales, 0,5 mL, listo para usar; Concentraciones: 0; 3, 20, 50, 100 U/mL. contiene conservante sin mercurio.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High**, (control) 2 viales (liofilizado), 0,5 mL, ver "Preparación de los Reactivos"
Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene conservante sin mercurio.
4. **SAM DIL Sample Diluent** (Solución para dilución de la muestra), 1 vial, 3,0 mL, listo para usar, Contiene conservante sin mercurio.
5. **ENZ CONJ 10x Enzyme Conjugate 10X concentrate** (Conjugado enzimático, 10X), 1 vial, 1,4 mL, Anticuerpo anti-CA 72-4 conjugado con la Peroxidasa de rábano; ver "Preparación de los Reactivos" Contiene conservante sin mercurio.
6. **ENZ CONJ DIL Conjugate Diluent** (Solución para dilución del conjugado), 1 vial, 14 mL, listo para usar. Contiene conservante sin mercurio.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 1 N acid solution.
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
9. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

Note: Se puede solicitar el Sample Diluent para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo. Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Control

Reconstituir el contenido liofilizado con 0,5 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar los controles varias veces antes de usar. **Nota:** Los controles reconstituidos debe alicuotarse y almacenarse a -20 °C.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de la solución de lavado concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. *La solución del lavado diluida es estable durante 1 semanas a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).*

Enzyme Conjugate

Diluir el *Enzyme Conjugate* concentrado 1:10 en el *Conjugate Diluent*. Estabilidad del Conjugado-Enzimático preparado: 1 semana a 2 °C - 8 °C en un recipiente cerrado.

Ejemplo:

Si se utiliza toda la placa, mezclar 1,2 mL del *Enzyme Conjugate* con 10.8 mL *Conjugate Diluent* hasta un volumen final de 12 mL. Si no se utiliza toda la placa de una vez, preparar la cantidad de Conjugado-Enzimático requerido mediante la mezcla de 100 µL del *Enzyme Conjugate 10X* conc. con 0.9 mL del *Conjugate Diluent* por tira (ver tabla mas abajo):

No. of strips	<i>Enzyme Conjugate 10X conc.</i> (µL)	<i>Conjugate Diluent</i> (mL)
1	100	0,9
2	200	1,8
3	300	2,7
4	400	3,6
5	500	4,5
6	600	5,4
7	700	6,3
8	800	7,2
9	900	8,1
10	1000	9,0
11	1100	9,9
12	1200	10,8

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Heparina o citrato). No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras**Suero:**

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2-8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 12 meses) han de congelarse vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Sample Diluent* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo. Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente)
 b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **20 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* (ver "Preparación de los Reactivos") a cada pocillo.
4. Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
5. Incubar durante **120 minutos** a temperatura ambiente.
6. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 5 veces con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante: La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
7. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
8. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
9. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
10. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 U/mL)	0,05
Standard 1 (3 U/mL)	0,14
Standard 2 (20 U/mL)	0,65
Standard 3 (50 U/mL)	1,25
Standard 4 (100 U/mL)	2,04

7 VALORES ESPERADOS

Los valores de referencia del ELISA CA72-4 para individuos sanos se determinaron midiendo los valores de sujetos aparentemente sanos. Se midieron 121 muestras masculinas y 119 femeninas. Se realizó un gráfico q-q (gráfico cuantil-cuantil) para comprobar la distribución normal de los valores y dar la oportunidad de identificar y excluir a sujetos potencialmente sanos falsos. El cálculo final de los percentiles 2,5 a 97,5 se realizó con un conjunto de datos que se despejó mediante el análisis q-q-plot. Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia.

	Hombres	Mujeres	Total
Número	121	119	240
Percentil 97.5 U/mL	3.84	6.56	5.55
Percentil 2.5 U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
MEDIA U/mL	0.72	0.99	0.86
MEDIAN U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Valor mínimo U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Valor máximo U/mL	30.51	26.78	30.51

Los resultados corresponden bien con valores del cut-off publicados entre 4 U/mL - 6 U/mL (Reference/Literature 3-6).

Se estableció el rango normal que corresponde bien a los datos obtenidos de la literatura. Los resultados por sí solos no deben ser la única razón para cualquier consecuencia terapéutica. Los resultados deben correlacionarse con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados. Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos. En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,60 U/mL – 100 U/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica (LoB, LoD, LoQ)

El límite de blanco (LoB) es de 0,44 U/mL.

El límite de detección (LoD) es de 0,60 U/mL.

El límite de cuantificación (LoQ) es de 0,82 U/mL.

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo. Triglicéridos > 7.5 mg/mL sufre disminución de sus valores. El ensayo contiene reactivos para minimizar la interferencia de HAMA y de anticuerpos heterofílicos. Sin embargo, títulos extremadamente elevados de HAMA o anticuerpos heterofílicos pueden interferir con los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de CA 72-4 en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

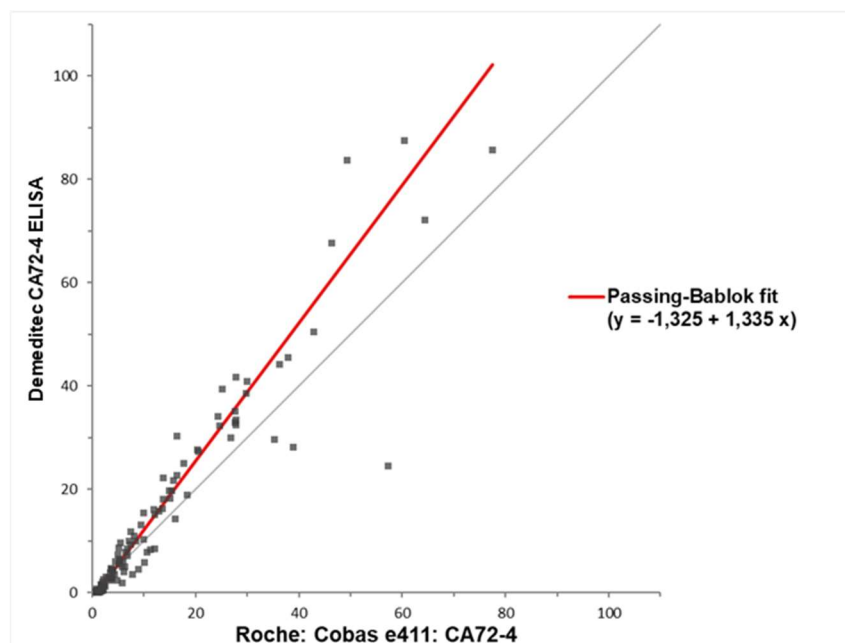
No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 6400 U/mL de CA 72-4.

10.4 Comparación de métodos

Una comparación del Demeditec CA72-4 ELISA DE5071 (y) y el método de referencia (x) utilizando muestras clínicas dio la siguiente correlación:

n = 130

r = 0.95



Los datos del Demeditec ELISA se correlacionan perfectamente con los datos del método de referencia.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

1 INTRODUCTION

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DEMEDIATEC CA72-4 ELISA** propose les matériaux requis pour la mesure quantitative de CA 72-4 (TAG-72) dans le sérum ou le plasma. **Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques in vitro.**

2 PRINCIPE DU TEST*

Le kit DEMEDIATEC CA72-4 ELISA est basé sur une réaction immuno-enzymatique en sandwich en phase solide. Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal (Clone CC49) dirigé contre un antigène spécifique de la molécule CA 72-4. Un aliquot de l'échantillon contenant le (la) CA 72-4 endogène est incubé dans un puits avec l'enzyme conjuguée, c'est-à-dire un anticorps anti-CA 72-4 (Clone B72.3) conjuguée avec la peroxidase de Raifort (horseradish peroxidase, HRP). Après l'incubation, le conjugué non-lié est éliminé durant le lavage des puits. La quantité de conjugué-HRP liée est proportionnelle à la concentration de CA 72-4 contenu(e) dans l'échantillon. Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration de CA 72-4 contenu(e) dans l'échantillon.

* Les anticorps utilisés dans ce test sont protégés par des brevets:

1. U.S. Patent No. 5,512,443, issued April 4, 1996 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-US-18)
2. Canadian Patent No. 1339980, issued August 4, 1998 entitled "Second generation monoclonal antibodies having binding specificity to TAG-72 and human carcinomas and methods for employing the same" (HHS Reference No. E-160-1987/0-CA-04)
3. U.S. Patent No. 4,522,918, issued June 11, 1985 (now expired) entitled "Process for Producing Monoclonal Antibodies Reactive with Human Breast Cancer" (HHS Reference No. E-185-1981/0-US-01)

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Material Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Éviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 1 N acidic solution. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPOSITION DU KIT

4.1 Contenu du kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Plaques de micro-titratio), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-CA 72-4 (monoclonal).
2. **CAL 0 - 4 Standard (Standard 0-4)**, 5 flacons, 0,5 mL, prêt à l'emploi ; Concentrations: 0; 3, 20, 50, 100 U/mL. contient agent de conservation sans mercure.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High** (Contrôle), 2 flacons (lyophilisé), 0,5 mL, voir « Préparation des réactifs » Les valeurs contrôles et limites sont indiquées sur l'étiquette du flacon ou sur la fiche QC. Contient agent de conservation sans mercure.
4. **SAM DIL Sample Diluent** (Solution pour dilution de l'échantillon), 1 flacon, 3,0 mL, prêt à l'emploi, contient agent de conservation sans mercure.
5. **ENZ CONJ 10x Enzyme Conjugate 10X concentrate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 1.4 mL, anticorps anti-CA 72-4 conjugué à la HRP; voir « Préparation des réactifs ». Contient agent de conservation sans mercure.
6. **ENZ CONJ DIL Conjugate Diluent** (Solution pour dilution du conjugué), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi. Contient agent de conservation sans mercure.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, Tétraméthylbenzidine (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, contient 1 N acide solution, Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
9. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solution de lavage), 1 flacon (concentré 40X), voir « Préparation des réactifs ».

Remarque : Un Sample Diluent pour la dilution de l'échantillon peut être fourni sur demande.

4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré (450 ± 10 nm)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées.
- Du papier absorbant.
- De l'eau distillée.

4.3 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2 - 8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date. Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 - 8 °C. Les micro-plaques doivent être stockées à 2 - 8 °C. Une fois la capsule d'aluminium ouverte, attention à bien refermer le flacon. Les kits ouverts conservent leur activité durant deux mois s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante avant utilisation.

Control

Reconstituer le contenu lyophilisé avec 0,5 mL d'eau distillée et laisser incuber au minimum 10 minutes. Mélanger les contrôles plusieurs fois avant utilisation. **Remarque :** Les contrôles reconstitués doivent être aliquotés et stockés à -20 °C.

Wash Solution

Diluer 30 mL de solution de lavage concentrée avec 1170 mL d'eau désionisée, pour un volume final de 1200 mL. **Remarque :** La solution de lavage diluée est stable une semaine à température ambiante (20 °C à 26 °C).

Enzyme Conjugate

Diluer l'Enzyme Conjugate concentrée à 1:10 dans le Conjugate Diluent. **Remarque :** Stabilité de l'enzyme conjuguée diluée : une semaine à 2 °C - 8 °C dans un container scellé.

Exemple:

Si la plaque entière est utilisée, diluer 1.2 mL d'*Enzyme Conjugate* avec 10.8 mL *Conjugate Diluent*, pour un volume final de 12 mL. Si la plaque entière n'est pas utilisée en une seule fois, préparer la quantité nécessaire d'enzyme conjuguée en mélangeant 100 µL d'*Enzyme Conjugate 10X conc.* avec 0.9 mL de *Conjugate Diluent* par barrette (voir la table ci-dessous):

No. of strips	<i>Enzyme Conjugate 10X conc.</i> (µL)	<i>Conjugate Diluent</i> (mL)
1	100	0,9
2	200	1,8
3	300	2,7
4	400	3,6
5	500	4,5
6	600	5,4
7	700	6,3
8	800	7,2
9	900	8,1
10	1000	9,0
11	1100	9,9
12	1200	10,8

4.5 Elimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité (voir chapitre 13).

4.6 Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer la DEMEDITEC, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

5 ECHANTILLON

Sérum ou plasma (EDTA-, Héparine- ou citrate plasma) peuvent être utilisés pour ce test. Ne pas utiliser des échantillons hémolysés, ictériques ou lipémiques. Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test.

5.1 Prélèvement et préparation des échantillons**Sérum:**

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

Plasma:

Le sang total doit être prélevé dans des tubes de centrifugation contenant un anti-coagulant (Sarstedt Monovette avec une préparation appropriée de plasma) et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à cinq jours à 2 - 8 °C avant d'être testés. Les échantillons stockés pour un temps prolongé (jusqu'à 12 mois) doivent être congelés à -20 °C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le *Sample Diluent* et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL l'échantillon + 90 µL *Sample Diluent* (bien mélanger).
 b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (bien mélanger).

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouveau cône de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- L'absorbance est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des micro-plaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **20 µL** de chaque *Standard*, *Control* et les échantillons, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Déposer **100 µL** d'*Enzyme Conjugate* (voir « Préparation des réactifs ») dans chaque puits. Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
4. Incuber pendant **120 minutes** à température ambiante.
5. Décanter le contenu des puits et rincer les puits 5 fois avec de la *Wash Solution* diluée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante: La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage!
6. Ajouter **100 µL** de *Substrate Solution* à chaque puits.
7. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de *Stop Solution* à chaque puits.
9. Lire la densité optique à **450 ± 10 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques **dans les 10 minutes** après avoir ajouté la *Stop Solution*.

6.3 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique. Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 Paramètres. (4 paramètres Rodbard ou 4 paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du plus haut standard doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.
- 6.

6.3.1 Exemple d'une courbe standard typique

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

Standard	Unités optiques (450 nm)
Standard 0 (0 U/mL)	0,05
Standard 1 (3 U/mL)	0,14
Standard 2 (20 U/mL)	0,65
Standard 3 (50 U/mL)	1,25
Standard 4 (100 U/mL)	2,04

7 VALEURS ATTENDUES

Les valeurs de référence du CA72-4 ELISA pour les individus sains ont été déterminées en mesurant les valeurs de sujets apparemment sains. 121 échantillons masculins et 119 échantillons féminins ont été mesurés. 121 échantillons masculins et 119 échantillons féminins ont été mesurés. Un graphique q-q (graphique quantil-quantil) a été réalisé afin de tester la distribution normale des valeurs et de donner la possibilité d'identifier et d'exclure les faux sujets sains potentiels. Le calcul final des percentiles 2,5 à 97,5 a été effectué à partir d'un ensemble de données qui ont été validées par l'analyse du graphique q-q. Il est fortement recommandé que chaque laboratoire détermine ses propres valeurs de référence.

	Masculin	Féminin	Total
Nombre	121	119	240
97.5e centile U/mL	3.84	6.56	5.55
2.5ème centile U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
MEAN U/mL	0.72	0.99	0.86
MEDIAN U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Valeur minimale U/mL	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Valeur maximale U/mL	30.51	26.78	30.51

Les résultats correspondent bien avec les valeurs (cut-off) publiés entre 4 U/mL – 6 U/mL (Référence/Littérature 3-6).

La fourchette normale a été établie et correspond bien aux données obtenues dans la littérature. Les résultats seuls ne doivent pas être à l'origine de conséquences thérapeutiques. Les résultats doivent être mis en corrélation avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTROLE DE QUALITE

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques. Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats. Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats. Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérés comme non valides. Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipettage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage. Après avoir testé les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DEMEDITEC.

9 CARACTERISTIQUES DU TEST

9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0,60 U/mL – 100 U/mL.

9.2 Spécificité des anticorps (Réaction croisée)

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

9.3 Sensibilité de l'analyse (LoB, LoD, LoQ)

La limite de blanc (LoB) est de 0,44 U/mL.

La limite de détection (LD) est de 0,60 U/mL.

La limite de quantification (LoQ) est de 0,82 U/mL.

9.4 Précision

9.5 Recouvrement

9.6 Linéarité

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

10 LIMITES D'UTILISATION

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

10.1 Substances parasites

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0.5 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 7,5 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage. Triglycérides > 7.5 mg/mL engendre une diminution des valeurs. Ce test contient des réactifs permettant de minimiser les interférences de l'HAMA ou des anticorps hétérophiliques. Néanmoins, des titres très élevés en HAMA ou en anticorps hétérophiliques peuvent interférer avec les résultats du test.

10.2 Drogues parasites

Jusqu'à présent, nous ne connaissons aucune substance (drogues) capable d'influencer la mesure de CA 72-4 dans un échantillon.

10.3 Effet de surdosage

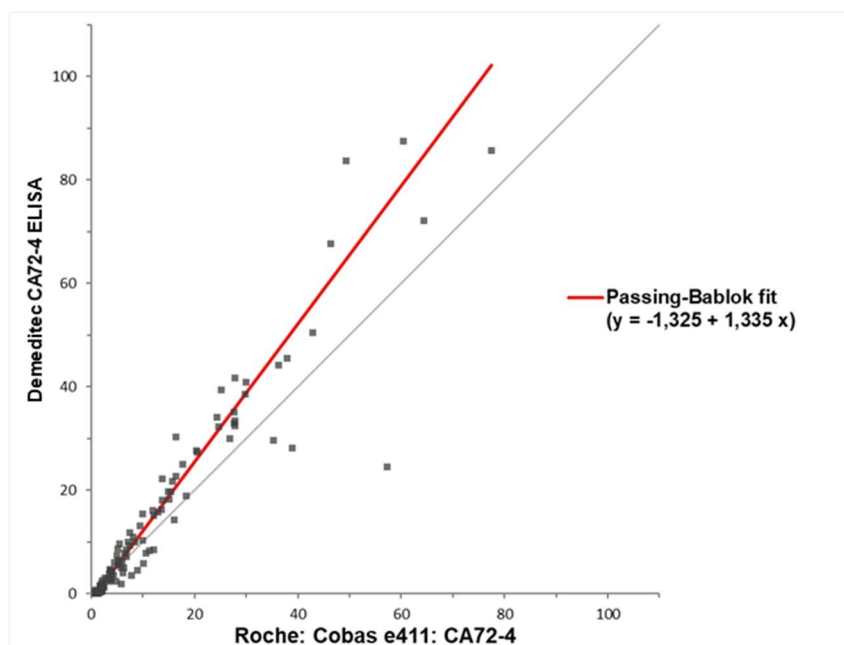
Jusqu' à 6400 U/mL de CA 72-4, aucun effet de surdosage n'a été détecté avec ce test.

10.4 Comparaison des méthodes

Une comparaison de la méthode Demeditec CA72-4 ELISA DE5071 (y) et de la méthode de référence (x) sur des échantillons cliniques a donné la corrélation suivante :

n = 130

r = 0.95



Les données de la méthode Demeditec ELISA sont parfaitement corrélées avec les données de la méthode de référence.

11 ASPECTS LEGAUX

11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôlés. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test. Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DEMEDITEC.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient. Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient. Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.














11.3 Responsabilité

Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement. Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

12 REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta