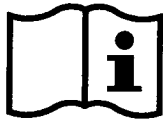


Product information

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



User's Manual

TPA ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of TPA (Tissue Polypeptide Antigen) in human serum



REF DE2092

 96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
3	ASSAY SPECIFICITY	3
4	SPECIMENS	3
5	PRECAUTIONS FOR USERS	3
6	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	3
7	COMPONENTS IN THE TPA ELISA	4
8	ASSAY PROCEDURE	4
9	PROCESSING OF RESULTS	4
10	REAGENT STORAGE	5
11	EXPECTED VALUES	5
12	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	5
13	ASSAY CHARACTERISTICS	5
14	WARRANTY	5
15	REFERENCES / LITERATURE	5
1	ANWENDUNGSBEREICH	6
2	TESTPRINZIP	6
3	TESTSPEZIFITÄT	6
4	PROBEN	6
5	VORSICHTSMASSNAHMEN	6
6	BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT IM LIEFERUMFANG)	6
7	KOMPONENTEN IM TPA ELISA	7
8	TESTDURCHFÜHRUNG	7
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	7
10	LAGERUNG DER REAGENZIEN	8
11	ZU ERWARTENDE WERTE	8
12	GRENZEN DES VERFAHRENS	8
13	TESTCHARAKTERISTIK	8
14	GARANTIE	8
15	REFERENZEN / LITERATUR	8
1	L'USO INTESO	9
2	PRINCIPIO DEL TEST	9
3	SPECIFICITÀ DEL TEST	9
4	CAMPIONI	9
5	PRECAUZIONI	9
6	MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO	9
7	COMPONENTI NEL TPA ELISA	10
8	PROCEDIMENTO DI ANALISI	10
9	ELABORAZIONE DEI RISULTATI	10
10	CONSERVAZIONE DEI REAGENTI	11
11	VALORI ASPETTATI	11
12	LIMITI DEL PROCEDIMENTO	11
13	CARATTERISTICHE DEL TEST	11
14	GARANZIE	11
15	BIBLIOGRAFIA	11
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	12

1 INTENDED USE

TPA ELISA is a one step *in vitro* diagnostic assay for the quantitative determination of cytokeratin 8 and 18 in serum. The assay is a sensitive indicator of tumor cell activity and is useful in the management of patients with carcinomas of epithelial origin.

2 PRINCIPLE OF THE ASSAY

TPA ELISA is a solid phase sandwich assay based on immunochemical technique. Standards, controls and samples react simultaneously with solid phase catcher antibodies (6D7 and 3F3) and the HRP conjugated detector antibody during incubation in the microstrip wells. After washing, the TMB substrate is added. Subsequently the reaction is stopped and the absorbance is read. The developed color is directly proportional to the concentration of the analyte.

3 ASSAY SPECIFICITY

TPA measures key epitopes of **TPA (Tissue Polypeptide Antigen)** fragments. The monoclonal 6D7 and 3F3 antibodies used in the test are specific for cytokeratin 8 and 18, with no detectable cross reactivity to other tumor associated antigens that may be present in patient samples.

4 SPECIMENS

Serum samples are recommended. Enough blood should be collected to be sufficient for 2 x 100 µL serum (duplicates) at each analysis. If the analysis will be performed within 24 h, the serum should be refrigerated (2 - 8 °C). If delayed analysis, serum should be frozen in aliquots (<-18 °C). Avoid repeated thawing and freezing. Do not use serum samples that are grossly lipemic, hemolysed or contaminated.

5 PRECAUTIONS FOR USERS

1. TPA ELISA is for *in vitro* diagnostic use only.
2. Wear protective gloves and protective goggles.
3. Do not use the kit after expiry date.
4. Do not mix reagents from different lots.
5. All patient specimens should be regarded as contagious and handled and disposed of according to appropriate regulations.
6. Avoid microbiological contamination of reagents.
7. Analysis should be performed according to GLP.
8. The accuracy of the test is related to adherence to the assay procedure and accurate volume pipetting.
9. The Stop Solution contains 1 N acidic solution, which might cause irritation on skin, and is harmful to eyes. In case of contact flush with plenty of water and seek medical advice.
10. The TMB Substrate might cause irritation on skin and eyes. In case of contact flush with plenty of water and seek medical advice.
11. ProClin 300 (60 ppm) used as preservative in this product might be allergenic. In case of contact flush with plenty of water and seek medical advice.
12. Material Safety Data Sheets are available on request.

6 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader (wavelength 450 nm).
- Microplate shaker (oscillation ~450 rpm).
- Microplate wash equipment.
- Routine laboratory equipment, *e.g.* precision pipettes and vortex.

7 COMPONENTS IN THE TPA ELISA

Materials supplied for 96 determinations.

1. **TPA Coated Microstrips:** 1 plate, 96 dry wells (12 x 8), coated with monoclonal anti-cytokeratin 8/18 antibodies (6D7 and 3F3). Packed in aluminum bag with desiccating device. Ready for use.
2. **TPA ELISA HRP Conjugate:** 2 vials, 0.5 mL/vial, conjugated antibody in protein stabilized buffer, pH 7.5 (11 x conc.). Should be diluted with TPA Diluent (Standard 0 ng/mL). Blue colored. Preservative added.
3. **TPA Diluent (Standard 0 ng/mL):** 1 vial, 15 mL, sample diluent and standard 0 ng/mL, protein stabilized buffer, pH 7.5. Preservative added. Ready for use.
4. **TPA ELISA Standard (1, 2, 5, 10, 15 ng/mL):** 5 vials standard, 1 mL/vial, TPA standard material in protein stabilized buffer, pH 7.5. Concentrations as stated on the QC data sheet. Preservative added. Ready for use.
5. **TPA Control (Low, High):** 2 vials control (1 mL/vial), Lyophilized Controls, TPA standard material in protein stabilized buffer, pH 7.5. Yellow colored. Preservative added.
6. **Wash Tablet:** 1 package, 1 tablet/package. The tablet should be dissolved in 500 mL fresh deionized water.
7. **TMB Substrate:** 1 vial, 22 mL. Protect from light and keep lid tightly closed. Do not sample more than what is needed for the analysis. Ready for use.
8. **Stop Solution:** 1 vial, 12 mL, 1 N acidic solution. Ready for use.
9. **Sealing Tape:** 1 sheet, Sealing tape for microstrips.
10. **TPA ELISA Certificate:** 1 protocol. Certificate of lot content.

8 ASSAY PROCEDURE

8.1 Reconstitution of Controls

Reconstitute the lyophilized kit controls the day before you run the test.

Add 1 mL fresh deionized water to each vial and keep the vials overnight at 2 °C to 8 °C.

8.2 Procedure

The assay should be performed at room temperature (RT; 22 °C ± 6 °C).

1. Allow all reagents and samples to adjust to RT. Vortex all reagents prior to use.
2. Based on the number of strips needed, dilute TPA ELISA HRP Conjugate (11 x conc.) with TPA Diluent (5.0 mL/vial). Mix thoroughly.
3. Pipette 100 µL standards, controls or samples per well (duplicates). Start with two empty wells for background absorbance measurement (blank).
4. Add 100 µL diluted HRP Conjugate to each well, except the two empty wells. Cover the strips with the supplied Sealing Tape. *NB! Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption.*
5. Incubate for 2 h ± 2 min on shaker (~450 rpm).
6. Prepare the wash solution. Dissolve Wash Tablet in 500 mL fresh deionized water.
7. Aspirate and wash the wells 3 x 300 µL with wash solution.
8. Add 200 µL TMB Substrate to each well, including the two empty wells. Incubate in darkness for 15 ± 1 min.
9. Add 100 µL Stop Solution to each well. Agitate on shaker 1 min (~450 rpm).
10. Read the absorbance at 450 nm, within 30 min after addition of the Stop Solution.
11. Calculate the cytokeratin 8 and 18 concentration (ng/mL) of the samples. Samples showing concentrations >15 ng/mL value should be suitably diluted with TPA Diluent (Standard 0 ng/mL) before repeated analysis.

9 PROCESSING OF RESULTS

Manual calculation or by using a computer software for handling ELISA-type data (curve fitting - Spline smoothed). For generation of valid data, ensure that included controls are within range.

Manual processing of results: Correct each absorbance value by subtracting the background absorbance (blank). Estimate the mean value for each duplicate. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance value for each standard (y-axis) against the corresponding concentration (x-axis). Determine the concentrations of the samples against the standard curve.

10 REAGENT STORAGE

The kit should be stored at 2 - 8 °C. **Do not freeze!** Store reagents in their original containers if not used at once. Reseal the Microstrip bag, including the desiccating device, if not all strips are used at once. The wash solution is stable for 4 weeks when stored at 2 - 8 °C. The diluted TPA ELISA HRP Conjugate is stable for 4 weeks when stored at 2 - 8 °C. The reconstituted controls are stable for 4 weeks when stored at 2 - 8 °C.

11 EXPECTED VALUES

We recommend that each laboratory establish their own normal range (cut-off value), due to differences between laboratories and locales with respect to population, laboratory techniques and selection of reference groups. The following values should only be a guideline. The normal values of the DEMEDITEC TPA ELISA were determined by measuring the values of apparently healthy individuals:

0 – 1.46 ng/mL (5 – 95 % Percentile)

12 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The assay values should be interpreted in conjunction with all available clinical information. The TPA ELISA is NOT to be used as a cancer screening test.

Has any of the patients tested undergone any kind of treatment for cancer?

Different kind of medications may affect the test result.

Is it known if any of the patients tested have been taking other medications?

The test results may be affected (increased) by general infections like a cold or influenza. Furthermore, increased values may also be found in case of pregnancy, liver disease and renal failure. If a temporary infection is suspected, it may be necessary to re-test in two weeks.

13 ASSAY CHARACTERISTICS

13.1 Measuring range

The measuring range is 0-15 ng/mL. The assay has no "high-dose hook effect" up to 500 ng/mL.

13.2 Reproducibility

The intra-assay reproducibility of the standard curve has a typical CV of <5 % (in duplicates). Inter-assay imprecision is characteristically of 5-10 % CV.

13.3 Sensitivity

The minimal detectable concentration in TPA ELISA is 0.1 ng/mL, defined as the concentration of TPA that corresponds to the absorbance being three standard deviations from the absorbance of standard 0 ng/mL.

13.4 Recovery

Specified quantities of TPA were added to human serum specimens. The recovery was 88-98 %.

14 WARRANTY

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any change or modification in the procedure, not recommended by DEMEDITEC, may affect the results. In such event DEMEDITEC disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and the fitness for use.

15 REFERENCES / LITERATURE

1. Stigbrand, T. *et al.* Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Bergqvist, M. *et al.* Cytokeratin 8 and 18 fragments measured in serum and their relation to survival in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19:1833-1836.
3. Sütterlin, M. *et al.* Clinical value of CYFRA 8/18 and TPS in the diagnosis and follow up of invasive breast cancer. *Anticancer Res* 1997; 17:2963-2966.

1 ANWENDUNGSBEREICH

TPA ELISA ist ein *in vitro* - Diagnostikum. Der Assay dient zur quantitativen Bestimmung von Cytokeratin 8 und 18 im Serum. Der Assay ist als Tumoraktivitätsmarker besonders bei der Überwachung von Patienten mit Karzinomen epithelialen Ursprungs hilfreich.

2 TESTPRINZIP

TPA ELISA ist ein Festphasen Sandwich Assay, der auf einer immunchemischen Technik basiert. Standards, Kontrollen und Proben reagieren während der Inkubation in den Mikroküvetten der Mikrotiterstrips gleichzeitig mit den Fängerantikörpern (6D7 und 3F3) auf der Innenwand und den HRP (Mee-rettichperoxidase) konjugierten Detektorantikörpern. Nach dem Waschen wird TMB Substrat hinzugegeben. Anschließend wird die Reaktion abgestoppt und die Extinktion gemessen. Die Farbentwicklung ist der Konzentration des Analyten direkt proportional.

3 TESTSPEZIFITÄT

TPA misst die wichtigsten Epitope der **TPA (Tissue Polypeptide Antigen)** Fragmente. Die im Test verwendeten monoklonalen 6D7- und 3F3-Antikörper sind spezifisch für Cytokeratin 8 und 18 mit keiner nachweisbaren Kreuzreaktivität zu anderen tumorassoziierten Antigenen, die im Patientenserum vorkommen können.

4 PROBEN

Serumproben werden empfohlen. Eine ausreichende Menge Blut sollte entnommen werden, um mindestens 2 x 100 µL Serum (Doppelbestimmung) für jede Messung zu erhalten. Wenn die Messung innerhalb von 24 Stunden erfolgt, sollten die Proben gekühlt (2 - 8 °C) gelagert werden. Für spätere Messungen sollte das Serum portioniert tiefgefroren (<-18 °C) werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Stark lipämische, hämolytische oder kontaminierte Proben können nicht verwendet werden.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

1. TPA ELISA ist ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik einzusetzen.
2. Schutzhandschuhe und Schutzbrille tragen.
3. Der Kit darf nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
4. Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen nicht gemischt werden.
5. Alle Patientenproben sollten als potentiell infektiös angesehen werden und entsprechend der geltenden Richtlinien gehandhabt und entsorgt werden.
6. Mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien sind zu vermeiden.
7. Die Messungen sollten gemäß GLP durchgeführt werden.
8. Die Richtigkeit des Test hängt von der exakten Testdurchführung und dem akkuraten Pipettieren der Volumina ab.
9. Die Stop Solution enthält 1 N saure Lösung, die Haut- und Augenirritationen verursachen kann. Bei Kontakt mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
10. Das TMB Substrate kann zu Reizungen von Haut und Augen führen. Bei Kontakt mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
11. ProClin 300 (60 ppm), das dem Produkt als Konservierungsstoff zugesetzt ist, kann Allergien auslösen. Bei Kontakt mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
12. Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich.

6 BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Mikroplattenphotometer (Wellenlänge 450 nm).
- Mikroplattenschüttler (Frequenz ~450 rpm).
- Mikroplatten Waschzubehör
- Routine-Laboraausstattung, z.B. Präzisionspipetten und Schüttler.

7 KOMPONENTEN IM TPA ELISA

Material ausreichend für 96 Bestimmungen.

1. **TPA Coated Microstrips:** 1 Platte, 96 trockene Mikroküvetten (12 x 8), beschichtet mit monoklonalen Anti-Cytokeratin 8/18 Antikörpern (6D7 und 3F3). Verpackt im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel. Gebrauchsfertig.
2. **TPA ELISA HRP Conjugate:** 2 Fläschchen, 0,5 mL/Fläschchen, konjugierte Antikörper in proteinstabilisiertem Puffer, pH 7.5 (Konzentrat 11-fach). Wird verdünnt mit TPA Diluent (Standard 0 ng/mL). Blau eingefärbt. Enthält Konservierungsmittel.
3. **TPA Diluent (Standard 0 ng/mL):** 1 Fläschchen, 15 mL, Verdünnungsreagenz und Standard 0 ng/mL, proteinstabilisierter Puffer, pH 7.5. Enthält Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.
4. **TPA ELISA Standard (1, 2, 5, 10, 15 ng/mL):** 5 Fläschchen Standard, 1 mL/Fläschchen, TPA Standardmaterial in proteinstabilisiertem Puffer, pH 7.5. Konzentrationen wie auf dem QC Datenblatt angegeben. Enthält Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.
5. **TPA Control (Low, High):** 2 Fläschchen (1 mL/Fläschchen), lyophilisierte Kontrollen, TPA Standardmaterial in proteinstabilisiertem Puffer pH 7.5. Gelb eingefärbt. Enthält Konservierungsmittel.
6. **Wash Tablet:** 1 Packung, 1 Tablette/Packung. Die Tablette wird mit 500 mL frisch entionisiertem Wasser aufgelöst.
7. **TMB Substrate:** 1 Fläschchen, 22 mL. Vor Lichteinfall schützen und Deckel gut schließen. Nicht mehr als für die Messung benötigt entnehmen. Gebrauchsfertig.
8. **Stop Solution:** 1 Fläschchen, 12 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.
9. **Sealing Tape:** 1 Blatt, selbstklebende Folie zum Verschließen der Mikrostreifen.
10. **TPA ELISA Certificate:** 1 Protokoll. Zertifikat zum Inhalt der Charge.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 Rekonstitution der Kontrollen

Die lyophilisierten Kitkontrollen (Low, High) einen Tag vor dem Testansatz rekonstituieren.

Die Kontrollen mit je 1.0 mL frisch entionisiertem Wasser auflösen und über Nacht bei 2 °C bis 8 °C lagern.

8.2 Testdurchführung

Der Assay sollte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. (RT: 22 °C ± 6 °C).

1. Alle Reagenzien & Proben auf Raumtemperatur bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch vortexen.
2. Je nach Anzahl der benötigten Streifen TPA ELISA HRP Conjugate (Konzentrat 11-fach) mit TPA Diluent (5.0 mL Diluent pro Fläschchen Conjugate) verdünnen. Sorgfältig mischen.
3. 100 µL Standards, Kontrollen und Proben pro Mikroküvette (Doppelbestimmung) pipettieren. Die ersten beiden Mikroküvetten für die Messung der Hintergrund-Extinktion (Blank) freilassen.
4. 100 µL verdünntes HRP Conjugate in jede Mikroküvette pipettieren, mit Ausnahme der zwei leeren Mikroküvetten. Die Streifen mit der mitgelieferten Folie (Sealing Tape) abdecken. *Bitte beachten! Die Schritte 4 und 5 müssen hintereinander ohne Zeitverzögerung durchgeführt werden.*
5. 2 Stunden ± 2 Min. im Schüttler (~450 rpm) inkubieren.
6. Waschlösung vorbereiten. Die Wash Tablet in 500 mL frischem entionisiertem Wasser auflösen.
7. Den Inhalt der Mikroküvetten absaugen und 3-mal mit 300 µL Waschlösung waschen.
8. 200 µL TMB Substrate in jede Mikroküvette pipettieren, einschließlich der zwei Blanks. 15 ± 1 Min. im Dunkeln inkubieren.
9. 100 µL Stop Solution in jede Mikroküvette hinzufügen. 1 Minute auf einem Schüttler (~450 rpm) durchmischen.
10. Extinktion bei 450 nm, innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stop Solution messen.
11. Berechnung der Cytokeratin 8 und 18 Konzentrationen (ng/mL) der Proben. Proben mit Konzentrationen >15 ng/mL müssen vor der Wiederholungsmessung mit TPA Diluent (Standard 0 ng/mL) verdünnt werden.

9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Manuelle oder Computergestützte Berechnung mittels Programm für Daten vom ELISA-Typ (Kurvenanpassung – geglättete Spline-Funktion). Um die Validität der Ergebnisse zu gewährleisten ist sicherzustellen, dass die Kontrollen innerhalb der Zielbereiche gefunden werden. *Manuelle Auswertung der Ergebnisse:* Jeden Extinktionswert durch Abzug der Blanks korrigieren. Den Mittelwert für jedes Doppelbestimmung berechnen. Eine Standardkurve durch Auftragen der Extinktionsmittelwerte für jeden Standard (y-Achse) gegen die korrespondierenden Konzentrationen (x-Achse) konstruieren. Die Konzentration der Proben an Hand der Standardkurve ermitteln.

10 LAGERUNG DER REAGENZIEN

Der Kit sollte bei 2 - 8 °C gelagert werden. **Nicht einfrieren!** Wenn die Reagenzien nicht auf einmal verbraucht werden, in den Originalgefäßen lagern. Wenn nicht alle Mikrostreifen auf einmal verbraucht werden den Rest in dem Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel lagern. Gut verschließen. Die Waschlösung ist bei Lagerung bei 2 - 8 °C 4 Wochen haltbar. Das verdünnte TPA ELISA HRP Conjugate ist bei Lagerung im Dunkeln bei 2 - 8 °C 4 Wochen haltbar. Die rekonstituierten Kontrollen sind bei 2 - 8 °C für bis zu 4 Wochen haltbar.

11 ZU ERWARTENDE WERTE

Auf Grund von Unterschieden zwischen Laboratorien, Regionen bezüglich der Population, Labortechniken und Auswahl der Referenzkollektive wird jedem Labor empfohlen, sich seine eigenen Referenzbereiche zu ermitteln. Die folgenden Werte können nur als Richtlinie gelten. Die Werte wurden mit dem DEMEDITEC TPA ELISA in den Seren gesunder Erwachsener ermittelt:

0 – 1,46 ng/mL (5 – 95 % Perzentile)

12 GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Ergebnisse sollten immer in Verbindung mit anderen verfügbaren klinischen Informationen bewertet werden. Der DEMEDITEC TPA ELISA kann **nicht** zum Screening auf Krebserkrankungen eingesetzt werden. *Wurde ein Patient im Rahmen einer Krebserkrankung behandelt? Verschiedene Medikationen können das Testergebnis beeinflussen. Ist es bekannt, dass ein getesteter Patient in irgendeiner Weise in Behandlung steht?* Erhöhte Werte finden sich auch z.B. bei Schwangerschaft, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen und allgemeinen Infektionen. Wenn eine temporäre Infektion vermutet wird, ist es notwendig, den Test nach zwei Wochen erneut durchzuführen.

13 TESTCHARAKTERISTIK

13.1 Messbereich

Der Messbereich ist 0-15 ng/mL. Ein "High-Dose Hook Effekt" kann bis zu 500 ng/mL nicht beobachtet werden.

13.2 Präzision

Die Intra-Assay-Präzision der Standardkurve hat typischerweise einen CV von <5% (in Doppelbestimmungen). Die Inter-Assay Präzision ist normalerweise 5-10% CV.

13.3 Sensitivität

Die kleinste messbare Konzentration im TPA ELISA beträgt 0,1 ng/mL, definiert als die Konzentration an TPA, die mit der Extinktion korrespondiert, die drei Standardabweichungen der Extinktion des Standard 0 ng/mL beträgt.

13.4 Wiederfindung

Bestimmte Mengen an TPA wurden humanen Serumproben hinzugefügt. Die Wiederfindung lag zwischen 88-98%.

14 GARANTIE

Die hier gezeigten Leistungsdaten wurden mit dem beschriebenen Verfahren ermittelt. Jede Veränderung oder Modifikation des Verfahrens, die nicht von DEMEDITEC empfohlen ist, kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem solchen Fall lehnt DEMEDITEC alle ausgedrückten, implizierten oder gesetzlichen Garantiezusagen ab, einschließlich der implizierten Zusicherung der Richtigkeit der Angaben über die Marktfähigkeit und die Eignung zum Gebrauch.

15 REFERENZEN / LITERATUR

1. Stigbrand, T. *et al.* Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Bergqvist, M. *et al.* Cytokeratin 8 and 18 fragments measured in serum and their relation to survival in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19:1833-1836.
3. Sütterlin, M. *et al.* Clinical value of CYFRA 8/18 and TPS in the diagnosis and follow up of invasive breast cancer. *Anticancer Res* 1997; 17:2963-2966.

1 L'USO INTESO

TPA ELISA è un test diagnostico in vitro monopassaggio per la determinazione quantitativa di citocheratina 8 e 18 nel siero. Il test è un indicatore sensitivo per l'attività di cellule tumorali ed è utile per la diagnosi e la terapia di pazienti affetti da carcinoma di origine epitelico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

TPA ELISA è un test sandwich su fase solida basato sulla tecnica immunochimica. Gli standard, i controlli ed i campioni reagiscono simultaneamente con anticorpi sequestratori (6D7 e 3F3) in fase solida e con l'anticorpo di rilevamento coniugato alla HRP (perossidasi di rafano) durante l'incubazione nei pozzetti. Dopo il lavaggio si aggiunge il substrato TMB. In seguito si ferma la reazione e si determina l'assorbanza. Il colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita.

3 SPECIFICITÀ DEL TEST

TPA misura frammenti degli epitopi chiave di TPA (antigene polipetide tissutale). Gli anticorpi monoclonali 6D7 e 3F3 usati nel test sono specifici per citocheratina 8 e 18, senza alcuna rilevabile reattività ad incrocio con altri antigeni associati a tumori che possono essere presenti nel campione di pazienti.

4 CAMPIONI

Si raccomanda l'uso di campioni di siero. Il sangue raccolto deve essere sufficiente per preparare 2 x 100 µL siero (in doppio) per ogni analisi. Se l'analisi viene eseguita entro 24 h, il siero deve essere conservato a 2 - 8 °C. Se l'analisi viene eseguita più tardi, il siero deve essere congelato (-18 °C) in aliquoti. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Non usare campioni di siero fortemente lipemici, emolitici o contaminati.

5 PRECAUZIONI

1. TPA ELISA è per l'analisi in vitro esclusivamente.
2. Portare guanti ed occhiali protettivi.
3. Non usare il kit dopo la data di scadenza.
4. Non mescolare reagenti provenienti da numeri di lotto differenti.
5. Tutti i campioni di pazienti devono essere trattati come potenzialmente contagiosi e pertanto devono essere trattati secondo le norme appropriate.
6. Evitare la contaminazione microbiologica dei reagenti.
7. L'analisi deve essere eseguita secondo le regole GLP (good laboratory practice).
8. L'esattezza del test dipende dall'aderenza al protocollo raccomandato e dall'esattezza dei volumi pipettati.
9. La soluzione d'arresto contiene 1 N acido soluzione che può provocare irritazioni cutanee e può danneggiare gli occhi. In caso di contatto lavare con abbondante acqua e consultare un medico.
10. Il substrato TMB (benzidine tetrametilico) può provocare irritazioni cutanee e degli occhi. In caso di contatto lavare con abbondante acqua e consultare un medico.
11. ProClin 300 (60 ppm) è usato come conservante in questo prodotto e può essere allergenico. In caso di contatto lavare con abbondante acqua e consultare un medico.
12. La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta.

6 MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Lettore per micropiastre (lunghezza d'onda 450 nm).
- Agitatore per micropiastre (oscillazione ~ 450 rpm).
- Materiale per il lavaggio dei micropiastre.
- Materiale standard di laboratorio, p.es. pipette e vortex.

7 COMPONENTI NEL TPA ELISA

Materiale sufficiente per 96 determinazioni.

1. **TPA Coated Microstrips** - Micropozzetti ricoperti con TPA: 1 piastra, 96 pozzetti secchi (12 x 8), ricoperti con anticorpi (6D7 e 3F3) monoclonali anti-citocheratina 8/18. Fornito in un contenitore di alluminio con materiale essiccante. Pronto all'uso.
2. **TPA ELISA HRP Conjugate** - Tracciante enzimatico HRP per TPA ELISA: 2 flaconi, 0.5 mL ciascuno, anticorpo coniugato in tampone stabilizzato, pH 7.5 (11 x concentrato). Deve essere diluito con il diluente TPA (Standard 0 ng/mL). Colore blu. Conservante aggiunto.
3. **TPA Diluent (Standard 0 ng/mL)**: 1 flacone, 15 mL. Pronto all'uso.
4. **Standard TPA (1, 2, 5, 10, 15 ng/mL)**: 5 flaconi con standards (1 mL ciascuno), il materiale standard TPA è stabilizzato in tampone, pH 7.5. Conservante aggiunto. Pronto all'uso.
5. **TPA Control (Low, High)** - Controllo TPA (alto, basso): 2 flaconi di controlli (1 mL ciascuno), controlli liophilizzati, il materiale standard TPA è stabilizzato in tampone, pH 7.5. Colore giallo. Conservante aggiunto.
6. **Wash Tablet** - Pastiglia di lavaggio: 1 pacchetto, 1 pastiglia/pacchetto. La pastiglia deve essere solubilizzata in 500 mL acqua deionizzata.
7. **TMB Substrate** - Substrato TMB: 1 flacone, 22 mL. Proteggere dalla luce e conservare chiuso. Non prelevare più di quanto necessario per un'analisi. Pronto all'uso.
8. **Stop Solution** - Soluzione d'arresto: 1 flacone, 12 mL, 1 N acido soluzione. Pronto all'uso.
9. **Sealing Tape** - Nastro sigillante: 1 foglio, nastro sigillante per i pozzetti.
10. **Certificato TPA ELISA**: 1 protocollo. Certificato del contenuto del lotto.

8 PROCEDIMENTO DI ANALISI

8.1 Reconstitution of Controls

Ricostituire il controlli liofilizzati (alto, basso) il giorno prima di eseguire il test.

Aggiungere 1 mL di acqua deionizzata ad ogni flacone e conservare i flaconi la notte a 2 e 8 ° C.

8.2 Procedimento

L'analisi deve essere eseguita a temperatura ambiente (RT; 22 °C ± 6 °C).

1. Portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente. Agitare tutti i reagenti prima dell'uso.
2. Dipendente dal numero di pozzetti necessari, diluire il tracciante TPA ELISA HRP (11 x conc.) con il diluente TPA (5.0 mL/flacone). Mescolare vigorosamente.
3. Pipettare 100 µL degli standard, dei controlli e campioni nei pozzetti (in doppio). Iniziare con due pozzetti vuoti per il rumore di fondo delle misure di assorbanza (blank).
4. Aggiungere 100 µL del tracciante HRP diluito a ciascun pozzetto, con eccezione dei due pozzetti vuoti. Coprire i pozzetti con il nastro sigillante. *NB! Passaggi 4 e 5 devono essere eseguiti senza interruzione.*
5. Incubare per 2 h ± 2 min su un agitatore (~450 rpm).
6. Preparare la soluzione di lavaggio. Dissolvere la pastiglia in 500 mL di acqua deionizzata.
7. Aspirare e lavare i pozzetti 3 volte von 300 µL del tampone di lavaggio.
8. Aggiungere 200 µL del substrato TMB in ogni pozzetto, incluso i due pozzetti vuoti. Incubare al buio per 15 ± 1 min.
9. Aggiungere 100 µL della soluzione d'arresto in ogni pozzetto. Agitare per 1 min (~450 rpm).
10. Determinare l'assorbanza a 450 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione d'arresto.
11. Calcolare la concentrazione di citocheratina 8 e 18 (ng/mL) dei campioni. Campioni aventi concentrazioni superiore a 15 ng/mL devono essere diluiti con il diluente TPA (Standard 0 ng/mL) e l'analisi deve essere ripetuta.

9 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo manuale o mediante una software per dati tipo ELISA (curve fitting – Spline smoothed). Per ottenere dati validi assicurarsi che i controlli stanno entro il campo stabilito. *Elaborazione manuale dei risultati*: correggere ciascun valore di assorbanza sottraendo il valore ottenuto con i blank. Calcolare il valore medio per ogni coppia doppia. Costruire una curva standard rappresentando il valore medio di assorbanza di ogni standard (asse y) contro la corrispondente concentrazione (asse x). Determinare le concentrazioni dei campioni mediante la curva standard.

10 CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Il kit deve essere conservato a 2 - 8 °C. **Non congelare!** Conservare i reagenti nei loro contenitori originali se non vengono usati tutt'assieme. La soluzione di lavaggio è stabile per 4 settimane se conservata a 2 - 8 °C. Il tracciante TPA ELISA HRP diluito rimane stabile per 4 settimane se conservato a 2 - 8 °C. I controlli ricostituiti sono stabili per 4 settimane se conservati a 2 - 8 °C.

11 VALORI ASPETTATI

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca il proprio campo normale (valore di soglia), a causa di differenze tra popolazioni, tecniche di laboratorio e selezione di gruppi di riferimento. I seguenti valori servono soltanto come valori guida. I valori normali di DEMEDITEC TPA ELISA sono stati determinati misurando i valori di individui apparentemente sani:

0 – 1.46 ng/mL (5 – 95 % percentile)

12 LIMITI DEL PROCEDIMENTO

I valori ottenuti con il test kit devono essere interpretati assieme a tutti gli altri dati clinici a disposizione. Il test TPA ELISA NON deve essere utilizzato per lo screening di malattie tumorali.

Alcun paziente analizzato è stato sottoposto a trattamenti anticancro?

Trattamenti con farmaci diversi possono influenzare il risultato.

È noto se alcun paziente analizzato è sottoposto a medicamentazione?

I risultati del test possono essere influenzati (ingranditi) da infezioni generali come raffreddori o influenze. Inoltre si possono trovare valori alterati in casi di gravidanza, malattie epatiche o insufficienze renali. Se si sospetta una infezione temporanea, può essere necessario ripetere il test dopo due settimane.

13 CARATTERISTICHE DEL TEST

13.1 Campo di misura

Il campo di misura è di 0 – 15 ng/mL. Questo test non è affetto dall'effetto "high-dose-hook" fino a 500 ng/mL.

13.2 Reproducibilità

La reproducibilità intra-test della curva standard tipicamente ha CV < 5% (misure doppie).

L'imprecisione inter-test è di circa 5-10% CV.

13.3 Sensitività

La concentrazione minima ritrovabile nel TPA ELISA è 0.1 ng/mL, definita come la concentrazione di TPA che corrisponde alla assorbanza uguale a tre deviazioni standard dalla assorbanza dello standard 0 ng/mL.

13.4 Ritrovabilità

Quantità specifiche di TPA sono state aggiunte a campioni di siero umano. La ritrovabilità era del 88 – 98%.

14 GARANZIE

I dati qui riportati sono stati ottenuti usando il protocollo indicato. Ogni cambiamento o modificazione del procedimento non raccomandato da DEMEDITEC può influenzare i risultati. In questi casi DEMEDITEC nega ogni garanzia data, sottintesa o legale, incluso le garanzie di vendita e di idoneità.

15 BIBLIOGRAFIA

1. Stigbrand, T. et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Bergqvist, M. et al. Cytokeratin 8 and 18 fragments measured in serum and their relation to survival in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19:1833-1836.
3. Sütterlin, M. et al. Clinical value of CYFRA 8/18 and TPS in the diagnosis and follow up of invasive breast cancer. *Anticancer Res* 1997; 17:2963-2966.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	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
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità