

Product information

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



User's Manual

CA 72-4 ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of CA 72 4 (TAG-72) in serum and plasma



DE5071



96

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST*	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	7
6	ASSAY PROCEDURE	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES	9
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF USE	10
11	LEGAL ASPECTS	11
12	REFERENCES / LITERATURE	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP*	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE	17
8	QUALITÄTS-KONTROLLE	17
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	17
10	GRENZEN DES TESTS	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENZEN / LITERATUR	18
1	INTRODUZIONE	19
2	PRINCIPIO DEL TEST*	19
3	PRECAUZIONI	19
4	COMPONENTI DEL KIT	20
5	CAMPIONI	22
6	ATTUAZIONE DEL TEST	22
7	VALORI NORMALI	24
8	CONTROLLO QUALITÀ	24
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	24
10	LIMITAZIONE DEL TEST	25
11	ASPETTI LEGALI	25
12	BIBLIOGRAFIA	25
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS	26

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC CA 72-4 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 CA 72 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. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-CA 72-4 antibody (monoclonal).
2. **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**, 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. **Sample Diluent**, 1 vial, 3 mL, ready to use,
Contains non-mercury preservative.
5. **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. **Conjugate Diluent**, 1 vial, 14 mL, ready to use
Contains non-mercury preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **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 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 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 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 2 weeks at room temperature.*

Enzyme Conjugate

Dilute *Enzyme Conjugate* concentrate 1:10 in *Conjugate Diluent*.

Stability of the prepared Enzyme-Conjugate: 1 weeks 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 µL sample + 90 µL *Sample Diluent* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *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. Dispense **20 µL** of each *Standard*, *Control* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL** 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. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

Important note:

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Add **100 µL** of *Substrate Solution* to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
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)
<i>Standard 0</i> (0 U/mL)	0.08
<i>Standard 1</i> (3 U/mL)	0.19
<i>Standard 2</i> (20 U/mL)	0.59
<i>Standard 3</i> (50 U/mL)	1.16
<i>Standard 4</i> (100 U/mL)	2.02

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC CA 72-4 ELISA the following values are observed:

Population	Valid N	Median	Mean	5th - 95th Percentile
apparently healthy subjects	65	0.72 U/mL	0.86 U/mL	0 – 2.68 U/mL

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

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 0.79 U/mL – 100 U/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

No cross reactivity was observed with related proteins.

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of *Standard 0* and was found to be 0.79 U/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)
1	20	1.4	2.2
2	20	1.6	1.6
3	20	1.6	2.4

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)
1	40	10.1	4.4
2	40	18.9	4.8
3	40	29.6	4.2

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	96.6	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	86.3	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.

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 **DEMEDIATEC CA 72-4 ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von CA 72-4 in Serum und Plasma eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP*

Der DEMEDIATEC CA 72-4 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 der 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.
- Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti- CA 72-4 -Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **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** (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. **Sample Diluent** (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **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. **Conjugate Diluent** (Konjugatverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
8. **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 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 für 2 Wochen 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</i> 10X konz. (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 Material 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 Waschschrilles!
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)
<i>Standard 0</i> (0 U/mL)	0,05
<i>Standard 1</i> (3 U/mL)	0,14
<i>Standard 2</i> (20 U/mL)	0,65
<i>Standard 3</i> (50 U/mL)	1,25
<i>Standard 4</i> (100 U/mL)	2,04

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Die Normwertermittlung wurde durchgeführt mit 65 gesunden Individuen.

Probanten	Anzahl	Median	Mittelwert	5 ^{te} - 95 ^{ste} Percentile
gesunde Männer und Frauen	65	0,72 U/mL	0,86 U/mL	0 – 2,68 U/mL

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

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 0,79 – 100 U/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt < 0,79 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.

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 CA 72-4 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 CA 72-4 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 monoclinale (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. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-CA 72-4 anticorpo (monoclinale)
2. **Standard (Standard 0-4)**, 5 flaconi, 0,5 mL; pronto all'uso
Concentrazione: 0; 3, 20, 50, 100 U/mL.
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi (liofilizzato), 0,5 mL
vedi „preparazione dei reagenti“
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Sample Diluent** (Diluente dei campioni), 1 flacone, 3 mL, pronto all'uso
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Conjugate Concentrate 10X** (tracciante enzimatico concentrato 10X), 1 flacone, 1.4 mL,
anti- CA 72-4 anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano
vedi „preparazione dei reagenti“.
Contiene conservante senza mercurio.
6. **Conjugate Diluent** (Diluente del tracciante), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
Contiene conservante senza mercurio.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 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 Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 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 °C - 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 °C - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 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 2 settimane a temperatura ambiente.

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 anti-coagulante 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 °C - 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 pipetamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione 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 esecuzione 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'esecuzione del test.

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

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC CA 72-4 ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	N Valori	Mediano	Valore medio	Percentile 5% - 95%
persone apparentemente sane	65	0.72 U/mL	0.86 U/mL	0 – 2.68 U/mL

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

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 0.79 U/mL – 100 U/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

I sieri di individui sani non erano reattivi con il DEMEDITEC CA 72-4 ELISA

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0.79 U/mL.

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

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 eterofili. Però livelli estremamente alti di HAMA o anticorpi eterofili 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.

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 reclamazione, 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.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	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	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.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	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
	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>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisiero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante