

CA 15-3

CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of CA 15-3 in human serum

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von CA 15-3 in humanem Serum

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 11
Bibliography/ Literatur	Page/ Seite	15
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung	Page/ Seite	16

1. INTRODUCTION

CA 15-3, is an abbreviation for cancer antigen 15-3.

CA 15-3 levels are most useful in following the course of treatment in women diagnosed with breast cancer, especially advanced breast cancer. CA 15-3 levels are rarely elevated in women with early stage breast cancer.

Cancers of the ovary, lung, and prostate may also raise CA 15-3 levels. Elevated levels of CA 15-3 may be associated with non-cancerous conditions, such as benign breast or ovarian disease, endometriosis, pelvic inflammatory disease, and hepatitis. Pregnancy and lactation can also cause CA 15-3 levels to rise.

CA15-3 is most useful for monitoring patients post-operatively for recurrence, particularly metastatic diseases. 96% of patients with local and systemic recurrence have elevated CA15-3, which can be used to predict recurrence earlier than radiological and clinical criteria. A 25% increase in the serum CA15-3 is associated with progression of carcinoma. A 50% decrease in serum CA15-3 is associated with response to treatment. CA15-3 is more sensitive than CEA in early detection of breast cancer recurrence. In combination with CA-125, CA15-3 has been shown to be useful in early detection of relapse of ovarian cancer. CA15-3 levels are also increased in colon, lung and hepatic tumours.

2. INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CA15-3 in human serum.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with monoclonal antibodies against CA15-3. During first incubation CA15-3 in samples and standards bind to the immobilised antibodies on the surface of the microtiter wells. Unbound substances will be removed by a subsequent washing step. During second incubation specific antibodies conjugated with peroxidase bind to CA15-3. Unbound conjugate will be removed by a subsequent washing step. In a third incubation the enzyme substrate TMB will be oxidized resulting in a blue colour. Addition of sulphuric acid (stop solution) stops the enzymatic reaction and turns the blue reaction product into yellow. Absorbance is measured at 450 nm. The amount of oxidized TMB is proportional to the amount of CA15-3 in the sample.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Coated Mircoplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with monoclonal antibodies against CA15-3; in aluminium foil.
- **Serum diluent:** 1 bottle containing 100 ml phosphate buffer (50mM, pH 7.4), 1 g/l BSA
- **Conjugate:** 1 bottle containing 22 ml of horseradish peroxidase labelled anti-mouse CA15-3 antibodies.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.25 g/l) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 20x conc.:** 1 bottle containing 30 ml (NaCl 9 g/l, Tween 20 0.05 g/l)
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Standards:** 6 bottles containing 2 ml standard solution with the following concentration:

Standard 0	0 U/ml
Standard 1	15 U/ml
Standard 2	30 U/ml
Standard 3	60 U/ml
Standard 4	120 U/ml
Standard 5	240 U/ml

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- 37 °C incubator
- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver a volume of 100 µl
- Distilled water
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The closed reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark. Once opened the reagents are stable for 60 days at 2...8°C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28°C) before starting the test run!

6.1. Coated microplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with monoclonal IgG antibodies against CA15-3. Store at 2...8°C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.*

6.2. Conjugate

The conjugate is ready to use.

6.3. CA15-3 Standards

The standards are ready to use. After first opening the standards are stable for another 6 months if stored at +4°C.

6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

6.6 Wash Solution

Dilute the content of each vial of the buffered wash solution concentrate (20X) with distilled water to a final volume of 600 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:20 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8°C.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The specimens shall be blood, serum in type and the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

To obtain the serum the blood should be collected in a plain redtop venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Specimen can be stored at 2...8°C for at short time (max five days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C (max. 30 days). Avoid repeated freezing and thawing.

Sample with concentration over 240 U/ml should be diluted one part of sample and three parts of standard 0.

For samples with concentration < 240 U/ml pipette in a test tube:

Serum	20 µl
Serum Diluent	1000 µl

Mix gently.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	e.g. A1 + B1)	for blank
2 wells	(e.g. C1+D1)	for standard 0
2 wells	(e.g. E1+F1)	for standard 1
2 wells	(e.g. G1+H1)	for standard 2
2 wells	(e.g. A2+B2)	for standard 3
2 wells	(e.g. C2+D2)	for standard 4
2 wells	(e.g. E2+F2)	for standard 5

It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 200 µl standards and diluted samples into their respective wells. Leave A1 and B1 for blank.
2. **Incubate for 60 min at 37 °C.**
3. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well five times with 300µl diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
4. Dispense 200 µl conjugate in wells with standards and samples, not into the blank well.
5. **Incubate for 60 min at 37 °C.**
6. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well five times with 300µl diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
7. Add 100 µl TMB substrate to each well.
8. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (+22...+28°C) in the dark.**
9. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
10. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm within 30 min after addition of stop solution against blank.

9. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of CA 15-3 for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations. If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

10. RESULTS

10.1. Note

The absorbance (OD) of standard 5 should be > 0.9.

10.2. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Plot the mean value of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (e. g.: Four Parameter Logistic). Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in U/ml.

10.3. Reference values

Healthy women are expected to have CA15-3 values below 35 U/ml.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA 15-3 that can be distinguished from the standard 0 is 0.5 U/ml at the 95 % confidence limit.

11.2. Specificity

The cross reaction of the antibody are shown in the table:

Antigens	Concentration	% Cross-reactivity
CA -125	1,000 U/ml	0.00
CA 19-9	1,000 U/ml	0.00
PSA	1,000 ng/ml	0.00
PAP	1,000 ng/ml	0.00
AFP	10,000 ng/ml	0.00
CEA	1,000 ng/ml	0.00

11.3. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (15x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.8\%$.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of five different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 11.4\%$.

11.4. Accuracy

The recovery on three serum samples spiked with 25 - 50 - 100 U/mL of antigen gave an average value (\pm SD) of $106.61\% \pm 8.86\%$.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 - 16 times gave an average value (\pm SD) of $103.71\% \pm 8.56\%$.

11.5 Correlation

The CA 15-3 kit (NovaTec) was compared with a commercial reference method. 54 serum samples were analysed according in both test system. The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.86x + 2.66$$

$$r^2 = 0.838$$

$$y = \text{CA 15-3 NovaTec}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

13. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV 1+2 antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Do not use heavily haemolysed or highly lipemic samples.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants.
- This method allows the determination of CA15-3 from 0.5 – 240 U/ml.

- The reagents contain Proclin 300® as preservative.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
--

13.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

14. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:

DNOV062

CA15-3 (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

CA 15-3 ist eine Abkürzung für Cancer Antigen 15-3.

Die CA 15-3 Konzentration ist sehr hilfreich bei der Therapiekontrolle von Frauen mit Brustkrebs, besonders in vorgeschrittenem Stadium. Im frühen Brustkrebsstadium ist CA 15-3 selten erhöht. Eierstock-, Lungen- Leber- und Prostatakrebs kann ebenfalls zu erhöhten CA15-3 Konzentrationen führen. Erhöhte Level werden aber auch in Zusammenhang mit nicht-krebsartigen Bedingungen wie gutartige Brust- oder Eierstockerkrankungen, Endometriose, Beckenentzündungen und Hepatitis. Schwangerschaft und Laktation können ebenfalls zu erhöhten Werten führen.

CA 15-3 ist besonders hilfreich für das Monitoren von Patienten nach einer Operation bezüglich Rezidiven und teilweise metastatischen Erkrankungen. Patienten mit lokalen oder systemische Rezidiven haben in 96% erhöhte CA 15-3 Konzentrationen, was benutzt werden kann, um Rezidive frühzeitiger vorherzusagen als mittels radiologischer oder klinischer Kriterien. Ein 25%iger Anstieg der Serumkonzentration an CA 15-3 ist verbunden mit der Progression eines Carcinoms. Ein 50%iger Abfall zeigt das Ansprechen auf eine Therapie an.

CA 15-3 ist sensitiver als CEA bei der Früherkennung von Brustkrebsrezidiven. CA15-3 hat sich in Kombination mit CA-125 als hilfreich erwiesen bei der Früherkennung von Rückfällen bei Eierstockkrebs.

2 VERWENDUNGSZWECK

Immunozytometrische kolorimetrische Method für die quantitative Bestimmung von CA 15-3 in humanem Serum.

3. TESTPRINZIP

Die Mikrotiterplatte ist mit monoklonalen Antikörpern gegen CA 15-3 beschichtet. Während der ersten Inkubation bindet das CA 15-3 aus den Proben und Standards an die immobilisierten Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Ungebundene Substanzen werden bei dem anschließenden Waschschrift entfernt. Während der zweiten Inkubation binden spezifische mit Peroxidase konjugierte Antikörper an CA 15-3. Nicht gebundenes Konjugat wird durch nachfolgendes Waschen entfernt. In der dritten Inkubation wird das Enzymsubstrat TMB oxidiert, was in einer Blaufärbung resultiert. Die Zugabe von Schwefelsäure (Stopplösung) beendet die Enzymreaktion und färbt das Reaktionsprodukt gelb, welches bei 450 nm nachgewiesen werden kann. Die Menge an oxidiertem TMB ist proportional zur Menge an CA 15-3 in der Probe.

4. MATERIAL

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Beschichtete Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen CA 15-3; in Aluminiumbeutel.
- **Serum-Verdünner:** 1 Flasche mit 100 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4), 1 g/l BSA
- **Konjugate:** 1 Flasche mit 22 ml HRP markierten anti- CA 15-3 Antikörpern
- **TMB Substrat Solution:** 1 Flasche mit 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.25 g/l) (Hautkontakt vermeiden).
- **Waschlösung 20x konz.:** 1 Flasche mit 30 ml (NaCl 9 g/l, Tween 20 0.05 g/l)
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.15 mol/l (Hautkontakt vermeiden).
- **Standards:** 6 Flaschen mit je 2 ml Standardlösung mit der folgenden Konzentration:

Standard 0	0 U/ml
Standard 1	15 U/ml
Standard 2	30 U/ml
Standard 3	60 U/ml
Standard 4	120 U/ml
Standard 5	240 U/ml

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- 37°C Inkubator
- Photometer mit Filtern 450 nm
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung
- Mikropipette mit Einmalspitzen (100 µl)
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Die original verschlossenen Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum haltbar, wenn sie bei +2...+8°C im Dunkeln gelagert werden.
Geöffnete Reagenzien sind 60 Tage stabil, wenn sie bei 2...8°C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (22...28°C) zu bringen!

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit monoklonalen IgG Antikörpern gegen CA 15-3 beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. Den Aluminiumbeutel nur öffnen, wenn er Raumtemperatur hat. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern.*

6.2. Konjugat

Das Konjugat ist gebrauchsfertig.

6.3. CA 15-3 Standards

Die Standards sind gebrauchsfertig.

6.4. TMB Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten*

6.5. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0.15 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren.

6.6 Waschlösung

Die konzentrierte Waschlösung mit destilliertem Wasser auf 600 ml verdünnen. Bei kleineren Volumen bitte das 1:20 Verhältnis beachten. Die verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C 30 Tage haltbar.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Als Probenmaterial muss humanes Serum verwendet werden, das unter Beachtung der üblichen Vorsichtsmaßnahmen gewonnen wurde.

Für einen genauen Vergleich mit den etablierten Normalwerten ist es wichtig, dass der Patient bei der morgendlichen Probenentnahme nüchtern ist.

Das Blut sollte durch Punktion einer Vene in einem einfachen Probengefäß mit rotem Deckel ohne Zusatz von Additiven oder anti-Koagulantien gewonnen werden. Das Blut gerinnen lassen. Abtrennung der Zellen vom Serum durch Zentrifugation.

Die Proben können bei 2...8°C für maximal 5 Tage im Kühlschrank gelagert werden. Falls eine Bearbeitung in dieser Zeit nicht möglich ist, können die Proben bei -20°C für bis zu 30 Tage gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Patientenproben mit CA 15-3 Konzentrationen über 240 U/ml können 1+3 mit Standard 0 verdünnt werden.

Für Proben mit einer Konzentration < 240 U/ml pipettieren in ein Teströhrchen:

Serum	20 µl
Serumverdünner	1000 µl

Sanft mischen.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen. Das Pipettieren der Proben sollte maximal 10 Minuten dauern um einen Drift innerhalb des Testes zu vermeiden. Wenn mehr als eine Mikrotiterplatte gemessen wird, wird empfohlen für jede Platte eine Standardkurve zu erstellen.

1 Vertiefung	(z.B. A1+B1)	Blank
2 Vertiefungen	(z. B C1+D1)	für Standard 0
2 Vertiefungen	(z.B. E1+F1)	für Standard 1
2 Vertiefungen	(z.B. G1+H1)	für Standard 2
2 Vertiefungen	(z.B. A2+B2)	für Standard 3
2 Vertiefungen	(z.B. C2+D2)	für Standard 4
2 Vertiefungen	(z.B. E2+F2)	für Standard 5

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Pipettiere 200 µl Standards und verdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen. A1 und B1 für den Blank freilassen.
2. **Inkubiere für 60 min bei 37 °C.**
3. Nach der Inkubation die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen und jede Vertiefung fünfmal mit 300µl verdünnter Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

4. Pipettiere 200 µl Konjugate in die entsprechenden Vertiefungen, jedoch nicht zum Blank.
5. **Inkubiere für 60 min bei 37 °C.**
6. Nach der Inkubation die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen und jede Vertiefung fünfmal mit 300µl verdünnter Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
7. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
8. **Inkubiere für 15 min bei Raumtemperatur (22 – 28°C) im Dunkeln.**
9. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Die Mikrotiterplatte leicht schütteln. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
10. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte Kontrollen im normalen, hohen und niedrigen Bereich für CA-125 messen, um die Leistungsfähigkeit des Testes zu überprüfen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und bei jedem Testlauf mitbestimmt werden. Qualitätskontrollaufzeichnungen sollten geführt werden, um die Performance der gelieferten Reagenzien zu überwachen. Um Trends erkennen zu können, sollten angemessene statistische Methoden etabliert werden. Jedes Labor sollte Annahmekriterien für die Testperformance aufstellen. Andere Parameter, die überwacht werden sollten, schließen den 80, 50 und 20% Abschnitt der Standardkurve für die Interassay Reproduzierbarkeit ein. Zusätzlich sollte die maximale Absorption mit früheren Messungen konsistent sein. Signifikante Abweichungen von der etablierten Leistungsfähigkeit können ein Indikator sein für unbemerkte Veränderungen der experimentellen Bedingungen oder Instabilität von Kitreagenzien. Um die Ursache der Abweichung zu ermitteln sollten frische Reagenzien verwendet werden.

Wenn Computer-gestützte Datenverarbeitung für die Berechnung der Ergebnisse benutzt wird, ist es zwingend das der erwartete Wert für die Standards innerhalb von 10% der angegebenen Konzentration liegt.

10. ERGEBNISSE

10.1. Hinweis

Die OD von Standard 5 sollte > 0,9 sein.

10.2. Berechnung der Ergebnisse

Berechne den Mittelwert der Absorption jedes Punktes der Standardkurve und jeder Probe. Trage die Mittelwerte der Absorption gegen die Konzentration der Standards auf. Zeichne die am besten passende Kurve durch die Punkte (z.B.: 4 Parameter Fit.).

Interpoliere die Werte der Proben anhand der Standardkurve, um die zugehörige Konzentration in U/ml zu erhalten.

10.3. Referenzwerte

Gesunden Frauen sollten einen CA 15-3 Wert von unter 35 U/ml haben.

11. TESTMERKMALE

11.1. Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare Konzentration an CA15-3, die vom Standard 0 unterschieden werden kann ist 0.5 U/ml bei einem 95% Konfidenzintervall.

11.2. Spezifität

Die Kreuzreaktion der Antikörper sind in der Tabelle aufgeführt.

Antigene	Konzentration	% Kreuzreaktivität
CA -125	1,000 U/ml	0.00
CA 19-9	1,000 U/ml	0.00
PSA	1,000 ng/ml	0.00
PAP	1,000 ng/ml	0.00
AFP	10,000 ng/ml	0.00
CEA	1,000 ng/ml	0.00

11.3. Präzision

Intraassay-Varianz

Die Variation innerhalb eines Testlaufs wurde ermittelt durch die wiederholte Bestimmung (15x) von drei verschiedenen Kontrollseren in einem Test. Die Intraassay-Varianz beträgt $\leq 7.8\%$.

Interassay-Varianz

Die Variation zwischen verschiedenen Testläufen wurde ermittelt durch die wiederholte Bestimmung (10x) von fünf verschiedenen Kontrollseren in verschiedenen Lots. Die Interassay-Varianz beträgt $\leq 11.4\%$.

11.4. Genauigkeit

Drei Serumproben wurden mit 25 – 50 – 100 U/ml Antigen gespiked. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug (\pm SD) 106,61% \pm 8,86%.

Der an drei Seren durchgeführte Verdünnungstest (2 – 4 – 8 – 16 fache Verdünnung) ergab einen durchschnittlichen Wert (\pm SD) von 103,71% \pm 8,56%.

11.5. Korrelation

Der NovaTec CA 15-3 ELISA wurde verglichen mit einem anderen kommerziell erhältlichen CA 15-3 Test. 54 Serumproben wurden in beiden Systemen gemessen. Die lineare Regressionskurve wurde berechnet.

$$y = 0,86 x + 2,66$$
$$r^2 = 0.838$$

y = CA 15-3 NovaTec kit

x = CA 15-3 MODULAR (Roche)

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

13. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Das Pipettieren der Reagenzien erfordert maximale Präzision.
- Keine stark hämolytischen oder lipämischen Proben verwenden.
- TMB Substrat keinem direkten Sonnenlicht, Metall oder Oxidantien aussetzen.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.
- Die Reagenzien enthalten Proclin 300® als Konservierungsmittel.
- Diese Methode ermöglicht die Bestimmung von CA 15-3 von 0,5 – 240 U/ml.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
--

13.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

14. BESTELLINFORMATION

Produktnummer: DNOV062

CA 15-3 (96 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY/ LITERATUR

- Aziz DC et al., Specialty Laboratories, (1991)
Aziz DC., A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
Aziz DC et al., J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
Clark GM et al., N Engl J Med 320:627-33 (1989)
Elledge RM et al., Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
Foekens JA et al., Cancer Res 50:3832-7 (1990)
Isola J et al., J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
Kute TE et al., Cancer Res 52:198-203 (1992)
McGuire WL et al., J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
Nicholson S et al., Br J Cancer 63:146-50 (1991)
Somerville JE et al., J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
Ueronese S et al., Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
Lotnicker M et al., Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

SCHEME OF THE ASSAY

CA15-3

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Blank	Standard 0 - 5	Sample
Standard 0 - 5	-	200 µl	-
Diluted Sample	-	-	200 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 60 min at 37 °C Wash each well five times with 300 µl diluted Wash Solution			
Conjugate	-	200 µl	200 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 60 min at 37 °C Wash each well five times with 300 µl diluted Wash Solution			
TMB	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark			
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric measurement at 450 nm			

NovaTec Immundiagnostica GmbH Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email : info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

DNOV062engl, dt-21022011-CR