

Instructions for use
CA 15-3 ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

1. INTRODUCTION**1.1 Intended Use**

The **CA 15-3 ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of CA 15-3 in serum and plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma).

1.2 Summary and Explanation

Breast cancer is one of the most common malignancies among women. Nine categories of breast tumor showed evidence of clinical utility and were recommended for use in practice. Among these, CA 15-3 which detects soluble forms of MUC-1 protein is the most widely used serum marker in patients with breast cancer (1-6). The main use of CA 15-3 is for monitoring therapy in patients with metastatic disease (1, 11). Metastatic disease may be present at the time of initial diagnosis and can occur at any time following primary therapy. Up to 70% of patients with metastases will respond to systemic treatment with cytotoxic drugs or endocrine therapy; therefore, early detection of recurrence is important to patient management (7). In patients previously treated for stage II or stage III breast cancer, early detection of recurrence cannot be readily accomplished by routine clinical or diagnostic studies alone. The use of a circulating serum tumor marker assay, such as CA 15-3 ELISA, can be useful in the identification of these patients. In addition, CA 15-3 may also be used in the postoperative surveillance of asymptomatic women who have undergone surgery for invasive breast cancer (1, 8). Finally, preoperative concentrations of CA 15-3 might be combined with existing prognostic factors for predicting outcome in patients with newly diagnosed breast cancer (9).

CA 15.3, although preferentially associated with breast cancer, is not tissue specific, and was shown to be elevated in different varieties such as ovarian cancer and colon adenocarcinoma (9). CA 15-3 assay values were not elevated in the sera of the majority of normal individuals or those with non-malignant conditions (10, 11).

NOTE: CA 15-3 values determined with different assays and from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity. The results reported by the laboratory to the physician must include the identity of the assay used. Assay values obtained with different assay methods cannot be used interchangeably. In addition, the main limitation of CA 15-3 as a marker for breast cancer is that serum levels are rarely increased in patients with early or localized disease (1).

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The CA 15-3 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 directed towards a unique antigenic site of the CA 15-3 molecule.

An aliquot of patient sample containing endogenous CA 15-3 is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-CA 15-3 antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of CA 15-3 in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of CA 15-3 in the patient sample.

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 microtiterplate 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 0.5 M H₂SO₄. 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 the manufacturer.

4. REAGENTS

4.1 Reagents provided

TM E-4431 **Microtiterwells**

Contents: 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-CA 15-3 antibody (monoclonal)

Standards and Controls – ready to use

Cat. no.	Component	Standard	Concentration	Volume / Vial
TM E-4401	 0	Standard 0	0 U/ml	3 ml
TM E-4402	 1	Standard 1	25 U/ml	0.5 ml
TM E-4403	 2	Standard 2	50 U/ml	0.5 ml
TM E-4404	 3	Standard 3	100 U/ml	0.5 ml
TM E-4405	 4	Standard 4	200 U/ml	0.5 ml
TM E-4451	 1	Control 1 (low)	For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.	0.5 ml (lyophilized)*
TM E-4452	 2	Control 2 (high)		0.5 ml (lyophilized)*

*see „Reagent Preparation“

Contents: Contain non-mercury preservative.

TM E-4413 **Assay Buffer** – ready to use

Contents: Contains non-mercury preservative.

Volume: 1 x 30 ml

TM E-4440 **Enzyme Conjugate** – ready to use

Contents: Anti-CA 15-3 antibody conjugated to horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.

Volume: 1 x 14 ml

FR E-0055 **Substrate Solution** – ready to use

Contents: Tetramethylbenzidine (TMB).

Volume: 1 x 14 ml

FR E-0030 **Wash Solution** – 40x concentrated

Volume: 1 x 30 ml

See "Preparation of Reagents".

FR E-0080**STOP-SOLN****Stop Solution** – ready to use

Contents: Contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Volume: 1 x 14 ml

Hazards
identification:



H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

Note: Additional *Standard 0* 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 8 weeks 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 are stable for 2 days at 2 °C to 8 °C.

For longer storage 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 deionized water to a final volume of 1200 ml.

The diluted *Wash Solution* is stable for 2 weeks at room temperature.

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 Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer 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 (at least six months) should be frozen only once 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 *Standard 0* 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 *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µl dilution a) 1:10 + 90 µl *Standard 0* (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 frame holder.
2.	Dispense 10 µl of each Standard, Control and samples with <u>new disposable tips</u> into appropriate wells.
3.	Dispense 250 µl Assay Buffer into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4.	Incubate for 60 minutes at room temperature.
5.	Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 4 times with diluted <i>Wash Solution</i> (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.	Dispense 100 µl Enzyme Conjugate into each well.
7.	Incubate for 60 minutes at room temperature.
8.	Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 4 times with diluted <i>Wash Solution</i> (400 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9.	Add 100 µl of Substrate Solution to each well.
10.	Incubate for 15 minutes at room temperature.
11.	Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
12.	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 <i>Stop Solution</i> .

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 > 200 U/ml. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 U/ml)	0.02
Standard 1 (25 U/ml)	0.45
Standard 2 (50 U/ml)	0.82
Standard 3 (100 U/ml)	1.43
Standard 4 (200 U/ml)	2.03

7. EXPECTED NORMAL VALUES

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

In a study conducted with 77 apparently normal healthy adults, using the CA 15-3 ELISA the following values are observed:

Population	N	Mean (U/ml)	Median (U/ml)	5 th Percentile (U/ml)	95 th Percentile (U/ml)
Healthy females and males	77	17.28	16.80	10.12	24.42

Cut-off values between 25 U/ml – 40 U/ml are recommended for patients with no evidence of disease (11, 12, 13).

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 standard 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 the manufacturer directly.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.50 U/ml – 200 U/ml.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

Cross reactivities of the assay are not known.

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the Standard 0 (S0) and was found to be 0.50 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	2.8	7.0
2	20	16.1	9.7
3	20	24.5	5.2

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (U/ml)	CV (%)
1	40	3.1	14.5
2	40	17.7	10.1
3	40	19.2	7.7

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding CA 15-3 solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous CA 15-3 + added CA 15-3) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [U/ml]	11.9	31.9	18.0
Average Recovery [%]	87.6	90.6	102.3
Range of Recovery [%]	from	85.1	85.0
	to	90.5	96.3

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [U/ml]	24.7	23.5	21.6
Average Recovery [%]	95.5	94.9	106.9
Range of Recovery [%]	from	87.4	88.5
	to	103.6	102.1

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 30 mg/ml) have no influence on the assay results.

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 15-3 in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 12 800 U/ml of CA 15-3.

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 the manufacturer.

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. Duffy M.J., Eyoy D., and McDermott E.W.: CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. Clin. Chim. Acta 2010; 411(23-24):1869-74.
2. Hilken J., et al.: Monoclonal antibodies against human milkfat globule membranes useful in carcinoma research. Prot. Biol. Fluids 1984;31:1013-1016.
3. Sekine, H., et al.: Purification and characterization of a high molecular weight glycoprotein detectable in human milk and breast carcinomas. J. Immunol. 1985;135(5):3610-3615.
4. Fujino, N., et al.: Clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA 15-3 antigen associated with human mammary carcinomas: Comparison with carcinoembryonic antigen. Jpn. J. Clin. Oncol. 1986;46:335-345.
5. Colomer, R., et al.: CA 15-3 Early results of a new breast cancer marker. Anticancer Research 1986;6:683-684.
6. Harris L. et al.: American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J. Clin. Oncol 2007; 25(33):5287-312.

7. Chittoor S, Swain S: Adjuvant Therapy in Early Breast Cancer. Am Fam Physician 1991;44:453–462.
8. Duffy M.J.: Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? Clin. Chem. 2006; 52(3):345–51.
9. Ugrinska A., et al.: Circulating tumor markers and nuclear medicine imaging modalities: breast, prostate and ovarian cancer. Q.J. Nucl. Med. 2002; 46(2):88–104.
10. Hayes, D.F., et al.: Comparison of circulating CA 15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. J. Clin. Oncol. 1986;4(10):1542–1550.
11. Pons-Anticet, D.F.M., et al.: Value of CA 15-3 in the follow-up of breast cancer patients. Brit. J. Cancer 1987;55(5):567–569.
12. Ruibal A, Genollá J, Rosell M, Gris JM, Colomer R: Serum CA 15.3 levels in patients with non-tumoral diseases, and establishment of a threshold for tumoral activity. Results in 1219 patients. Int J Biol Markers 1(3):159–60, 1986.
13. Colomer R, Ruibal A, Navarro M, Encabo G, Sole LA, Salvador L: Circulating CA 15.3 levels in breast cancer. Our present experience. Int J Biol Markers 1(2):89–92, 1986.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		

1. EINLEITUNG

Der **CA 15-3 ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von CA 15-3 in Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2. TESTPRINZIP

Der CA 15-3 ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des CA 15-3-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti-CA 15-3-Antikörper, 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 15-3-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

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 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 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure 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.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

4. BESTANDTEILE DES KITS**4.1 Kitinhalt****TM E-4431**

96

Mikrotiterwells

Inhalt:

96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-CA 15-3-Antikörper (monoklonal) beschichtet.

Standards und Controls – gebrauchsfertig

Cat. no.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen / Flasche
TM E-4401	CAL 0	Standard 0	0 U/ml	3 ml
TM E-4402	CAL 1	Standard 1	25 U/ml	0,5 ml
TM E-4403	CAL 2	Standard 2	50 U/ml	0,5 ml
TM E-4404	CAL 3	Standard 3	100 U/ml	0,5 ml
TM E-4405	CAL 4	Standard 4	200 U/ml	0,5 ml
TM E-4451	CONTROL 1	Control 1 (low)	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.	0,5 ml (lyophilized)*
TM E-4452	CONTROL 2	Control 2 (high)		0,5 ml (lyophilized)*

Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Inhalt: Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

TM E-4413 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** (Assaypuffer) – gebrauchsfertig

Inhalt: Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

Volumen: 1 x 30 ml

TM E-4440 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) – gebrauchsfertig

Inhalt: Anti-CA 15-3-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

Volumen: 1 x 14 ml

FR E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution** (Substratlösung) – gebrauchsfertig

Inhalt: Substratlösung TMB

Volumen: 1 x 14 ml

FR E-0030 **WASH-CONC 40x** **Wash Solution** (Waschlösung) – **40x** konzentriert

Volumen: 1 x 30 ml

Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

FR E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung) – gebrauchsfertig

Inhalt: enthält 0,5 M H₂SO₄;
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Volumen: 1 x 14 ml

Mögliche
Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum.
Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen 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: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Kontrollen 2 Tage haltbar.
Für eine längere Aufbewahrung in Aliquots bei -20 °C einfrieren.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 ml) mit 1170 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 ml verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller 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 Zitratplasma) 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 Antikoagulans 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 bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (mindestens 6 Monate) 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 *Standard 0* 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 *Standard 0* (gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl *Standard 0* (gründlich mischen).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt 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 10 µl Standard, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3.	250 µl Assay Buffer in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4.	60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5.	Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 4-mal mit verdünnter <i>Wash Solution</i> (400 µl) 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 Enzyme Conjugate in jedes Well geben.
7.	60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8.	Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 4-mal mit verdünnter <i>Wash Solution</i> (400 µl) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	100 µl Substrate Solution in jedes Well geben.
10.	15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stop Solution in jedes Well abstoppen.
12.	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 ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 U/ml)	0,02
Standard 1 (25 U/ml)	0,45
Standard 2 (50 U/ml)	0,82
Standard 3 (100 U/ml)	1,43
Standard 4 (200 U/ml)	2,03

7. ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie wurden die Proben von 77 gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem CA 15-3 ELISA folgende Werte:

Population	N	Mittelwert (U/ml)	Median (U/ml)	5 ^{te} Perzentile (U/ml)	95 ^{ste} Perzentile (U/ml)
Frauen und Männer	77	17.28	16.80	10.12	24.42

In der Literatur werden Grenzwerte (cut-off) von 25 U/ml – 40 U/ml für gesunde Kollektive diskutiert (11, 12, 13).

8. QUALITÄTSKONTROLLE

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 dem Hersteller in Verbindung.

9. ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,50 U/ml – 200 U/ml

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Für diesen Test sind Kreuzreaktionen nicht bekannt.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards* 0 (n = 20), beträgt 0,50 U/ml.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10. GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

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 30 mg/ml) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Der Test enthält Reagenzien, um Interferenzen mit HAMA oder heterophilen Antikörpern zu minimieren. Trotzdem 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 15-3-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 12 800 U/ml CA 15-3 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 dem Hersteller 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 Version der Gebrauchsanweisung.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		