


EIAgen GI Marker CA 19-9 Kit

REF LI4040

 96 tests

 **Adaltis Italia S.p.A.**
Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Tel. +39-051-6136511 – Fax +39-051-575280
www.adaltis.com









FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY



Store at 2...8 °C

en

SYMBOLS USED ON LABELS

MTPLATE	microplate
CONJ HRP 20x	HRP Conjugate Concentrate
BIOTIN Anti-CA19-9	Biotin Anti-CA 19-9
DIL CONJ	conjugate diluent
CAL0	Calibrator 0
CAL1	Calibrator 1
CAL2	Calibrator 2
CAL3	Calibrator 3
CAL4	Calibrator 4
CAL5	Calibrator 5
CONTROL1 CONTROL2	Controls
SOLN TMB	TMB substrate
SOLN STOP	Stop solution
WASH BUF 25X	washing buffer concentrate
LOT	Lot number
REF	Catalogue Code
	Expiry date (Use by...)
 2°C  8°C	Temperature limitation (store at 2...8°C)
	Number of tests
	Keep away from sunlight
	Manufactured by
	Attention, See Instructions For Use
IVD	In vitro diagnostic medical device (In vitro diagnostic use)
	Biological risks (see SECTION 7- Warnings and Precautions).

1.0 INTENDED USE

The EIAgen GI Marker CA19-9 kit is intended for the quantitative determination of the cancer associated antigen CA19-9 in human serum.

2.0 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The EIAgen GI Marker CA19-9 kit is based on a mouse monoclonal antibody, C192, highly specific for the sialyl Lewis^x epitope, also known as CA19-9 antigen (1). In adults, the epitope is typically expressed in trace amounts on mucosal cells of gastrointestinal epithelia.

In patients with malignant disease, the epitope may appear associated with high molecular weight mucin in blood. Assays for CA19-9 are frequently used to monitor gastrointestinal malignancies such as pancreatic, gall bladder, gastric, and colorectal cancers (2, 3).

3.0 PRINCIPLE OF THE TEST

The EIAgen GI Marker CA19-9 kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are incubated together with a biotinylated Anti-CA19-9 monoclonal antibody (MAb) C192 (derived from mice) in streptavidin coated microtiter strips. CA19-9 present in calibrators or samples is adsorbed to the streptavidin coated microtiter strips by the biotinylated Anti-CA19-9 MAb during the incubation. The strips are then washed and incubated with HRP (Horseradish peroxidase) labeled Anti-CA19-9 MAb C192. After washing, buffered Substrate/Chromogen reagent (hydrogen peroxide and 3, 3', 5, 5' tetra-methylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue color will develop if antigen is present. The intensity of the color is proportional to the amount of CA19-9 present in the samples. The color intensity is determined in a microtiter plate photometer at 620 nm. Optionally the color turns to yellow after the addition of the Stop Solution and can be read at 405 nm.

Calibration curves are constructed for each assay by plotting optical density (OD) value versus the concentration for each calibrator. The CA19-9 concentrations of patient samples are then read from the calibration curve.

4.0 CONTENT OF THE KIT

4.1 MICROPLATE (code 35PIA) **MTPLATE**

1 microplate of 12 strips of 8 breakable The wells are coated with streptavidin. After opening, immediately return unused strips to the aluminium pouch, containing desiccant. Reseal carefully to keep dry.

4.2 CONJUGATE (code 35HRP) **CONJ|HRP|20X**

1 vial of 0.75 mL containing 20X concentrate Stock Solution of HRP conjugated to Anti-CA19-9 monoclonal antibody from mouse (approximately 40 µg/mL). Contains preservatives.

To be diluted with Conjugate Diluent prior to use.

Preparation of Conjugate (HRP-Anti-CA19-9) working solution: Prepare the required quantity of Conjugate working solution by mixing 50 µL of Conjugate 20x concentrate with 1 mL of Conjugate Diluent per strip (see table below).

N° of strips	CONJUGATE µl	Conjugate Diluent ml
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

To be sure of the stability use a clean plastic or glass bottle for preparation of the Conjugate working solution.

Alternative: Pour the content of the Conjugate 20x concentrate into the vial of Conjugate Diluent and mix gently. Make sure that the entire content of the Conjugate 20x concentrate is transferred to the vial of Conjugate Diluent.

STORAGE: the Conjugate working solution is stable for 3 weeks at 2–8°C in a sealed container. Do not prepare more Conjugate working solution than will be used within this period and make sure that it is stored properly.

4.3 CONJUGATE DILUENT (code 35HRPD) **DIL|CONJ**

1 vial containing 15 mL of phosphate citrate-buffer (pH 7.5) with bovine serum albumin, blocking agents, Tween 40, an inert blue dye, and 0.01 % methylisothiazolone (MIT) as preservative.

Ready for use.

4.4 CALIBRATORS

6 vials of 0.75 ml (except calibrator 0: 8ml). Each calibrator contains CA 19-9 antigen in a Tris-HCl buffered salt solution containing bovine serum albumin, an inert yellow dye and 0.05% sodium azide as preservative. Ready to use. The concentrations of calibrators are:

Calibrator	symbol	code	concentration
Calibrator 0	CAL0	35CAL0	0 U/mL
Calibrator 1	CAL1	35CAL1	15 U/mL
Calibrator 2	CAL2	35CAL2	30 U/mL
Calibrator 3	CAL3	35CAL3	60 U/mL
Calibrator 4	CAL4	35CAL4	120 U/mL
Calibrator 5	CAL5	35CAL5	240 U/mL

Calibrator 0 should also be used for dilution of samples as Sample Diluent.

Reference materials.

Since no common reference material is available for CA19-9 antigen, ADALIS CA19-9 EIA Calibrator values are assigned against a set of in-house reference standards.

4.5 BIOTIN Anti CA 19-9 (code 35BT) BIOTIN Anti-CA19-9

1 vial containing 15 ml of solution of biotin labelled Anti-CA19-9 monoclonal antibody from mouse (approximately 2 µg/mL). Contains phosphate citrate buffer (pH 7.5), bovine serum albumin, blocking agents, Tween 40, an inert red dye, and 0.01 % methylisothiazolone (MIT) as preservative.

Ready to use.

4.6 CONTROLS

Control	symbol	code	
Control 1	CONTROL 1	35CTRL1	1 vial of 0.75 mL
Control 2	CONTROL 2	35CTRL2	1 vial of 0.75 mL

1 vial of each control containing 0.75 mL of CA 19-9 antigen in a tris-HCl buffered salt solution containing bovine serum albumin and 0.05% sodium azide as preservative.

Ready to use.

4.7 TMB-SUBSTRATE (code TMBB)

SOLN TMB

1 vial containing 12 mL of ready-to-use Hydrogen peroxide and 3,3',5,5' tetra-methylbenzidine (TMB).

Ready to use.

4.8 STOP SOLUTION (code STOPB)

SOLN STOP

1 vial containing 15 mL of 0.12 M hydrochloric acid.

Ready to use.

4.9 WASHING BUFFER 25X (code TLAVB)

WASH BUF 25X

1 bottle containing 50 mL of wash buffer concentrate. Wash buffer concentrate contains a Tris-HCl buffered salt solution with Tween 20. contains German II as preservative.

Preparation of Wash Buffer working solution: Pour the 50 mL Washing Buffer Concentrate into a clean container and dilute 25-fold by adding 1200 mL of distilled or deionised water to give a Wash Buffer working solution.

STORAGE: the stability of diluted wash buffer is 2 weeks at 2-25°C in a sealed container.

5.0 STORAGE AND STABILITY AFTER THE FIRST OPENING

- Store kit components at 2...8° C and do not use after the reported expiry date.
- After use, the microplate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2...8°C.

The opened kit should be used within expiry date indicated on labels.

6.0 MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microtiter plate shaker:** Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 700—900/min.
- Microtiter plate wash device:** Automatic plate wash capable of performing 1, 3 and 6 washing cycles, or semi manual microtiter plate washing device connected to vacuum pump or water-jet vacuum and a liquid trap for retaining aspirated liquid. The Nunc Immuno-8 manual strip washer is recommended if an automatic microtiter plate wash is not used.
- Microtiter plate photometer:** with a wavelength of 620 nm and/or 405 nm, and an OD range of 0 to 3.0.
- Precision pipettes:** with disposable plastic tips for dispensing microlitre volumes. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic

tips for delivery of 100 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing millilitre volumes.

- Distilled or deionised water:** For preparation of Wash Solution.
- Others:** reagent reservoirs for multichannel pipettes, paper towels, and timer

7.0 WARNINGS OR PRECAUTIONS

7.1 SAFETY PRECAUTIONS

- All reagents in this kit are for in vitro diagnostic use only
- Only experienced laboratory personnel should use this test and handling should be agreement with GLP.
- Operators should wear gloves and protective clothing when handling any patient sera or serum based products.
- Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, hydrochloric acid and preservatives which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth. Avoid contact of reagents or patient samples with skin or mucous membranes. If contact occurs, immediately flush with large quantities of water. Avoid splashing or creation of aerosols. Reusable glassware must be thoroughly washed and rinsed so that it is total of all detergents.
- Materials used in the preparation of human source reagents have been tested for the presence of antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV 1 and 2), as well as for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and HCV and found to be negative. All material is tested with FDA approved assays. Because no test method can offer complete assurance that HIV, HBsAg or other infectious agents are absent, it is recommended that human serum based products be handled with the same precautions used for patient specimens.
- Follow all local, state and national regulations for disposal of all waste material. To dispose of reagents containing azide, flush away using copious amounts of water. Dispose with caution as sodium azide can form explosive compounds on prolonged contact with lead or copper piping.

7.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

A. Correct use of reagents.

- The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this package insert. Do not use reagents from other manufacturers in the kits.
- Do not use reagents from other EIAgen kits with this kit. Do not mix reagents from different kit lots.
- Do not dilute or adulterate the kit reagents, unless directed by the kit protocol.
- The **TMB Substrate** is very sensitive for contamination. The TMB HRP Substrate should be colourless or slightly bluish. A blue colour indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded. For optimal stability of the TMB Substrate, pour the required amount from the vial to a carefully cleaned reservoir or preferably a disposable plastic tray to avoid contamination of the reagent. Be sure to use clean disposable plastic pipette tips (or respenser pipette tip).

B. Correct pipetting procedure.

- Be sure to use clean disposable plastic pipette tips and a proper pipetting technique when handling samples and reagents. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid. A proper pipetting technique is of particular importance when handling the TMB HRP-Substrate solution.

C. Correct washing procedure.

- Pre-washing of the strips before the assay is necessary
 - Microplate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results
- WASHING PROCEDURE:** A careful washing procedure of the strips is essential. Ensure that each well is filled up completely to the top edge and that the aspiration of the wells between and after the washing cycles is complete and the wells are dry. If there is liquid left in the wells, invert the plate and tap it carefully against absorbing paper.
- Automatic strip washer:** Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles prior to and after each incubation step. The aspiration/wash device should not be left standing with the Wash Solution for long periods as the needles may get clogged, giving poor liquid delivery and suction.

D.. Adherence to assay procedure and specifications

- The test protocol must be followed strictly. Observe the indicated incubation times and temperature and the washing procedure. These are critical steps. Do not allow the wells to dry between incubations. Please refer also to section 9.0_ASSAY PROCEDURE.
- Include the positive and negative controls in every test run to monitor for reagent stability and correct assay performance. The obtained OD values for calibrators and concentration for controls have to be always compared to the ones reported in QC sheet. Please refer also to section 10.1_VALIDITY OF THE ASSAY AND 10.2_QUALITY CONTROL.
- Do not use the kit to determine values outside the range indicated in the Instruction for Use. Please refer also to section 10.5_MEASUREMENTS RANGE.

8.0 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The kit is intended for use with serum. Collect blood by venipuncture and separate the serum according to common procedures. Samples can be stored at 2–8°C for 24 hours. For longer periods stores samples at -70°C or below. Samples should not be stored in a self-defrosting freezer and not be thawed and refrozen before analysis. Allow frozen samples to thaw slowly, preferably at 2–8°C over night and then bring the samples to room temperature before analysis.

9.0 ASSAY PROCEDURE

9.1 REAGENT PREPARATION

- Bring all reagents to room temperature (20...25°C). The assay should only be performed at temperatures between 20–25°C to obtain accurate results.
- Prepare washing buffer working solution according to par. 4.9;
- Prepare conjugate working solution according to par 4.2;
- Select sufficient microwells for the test. Transfer the required number of microtiter plate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant and reseal carefully).
- Before starting to pipette calibrators and patient specimens it is advisable to mark the strips to be able to clearly identify the samples during and after the assay.
- Perform each determination in duplicate for both calibrators and patient samples. A calibration curve should be run with each assay.

9.2 PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- A. Wash** each strip once with the Wash Buffer working solution. Do not wash more strips than can be handled within 30 min.
- B. Pipette** in duplicate 25 µL of the Calibrators (CAL 0, 1, 2, 3, 4, 5), Controls (C 1, C 2) and patient specimens into the strip wells;
- C. Add** 100 µL of Biotin Anti-CA19-9 to each well using a 100 µL precision pipette (or an 8-channel 100 µL precision pipette). Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
- D. Incubate** the plate for 2 hours (± 5 min) at room temperature (20-25°C) with constant shaking of the plate using a microtiter plate shaker.
- E.** After the first incubation **aspirate** and **wash** each strip 3 times using the wash procedure described in section 7.2C
- F. Add** 100 µL of Conjugate working solution to each well. Use the same pipetting procedure as in item E above.
- G. Incubate** the frame for 1 hour (± 5 min) at room temperature (20–25°C) with constant shaking.
- H.** After the second incubation **aspirate** and **wash** each strip 6 times, using the wash procedure described in section 7.2C.
- I. Add** 100 µL of TMB HRP-Substrate to each well using the same pipetting technique as in item 4. The TMB Substrate should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 5 min.
- J. Incubate** for 30 min (± 5 min) at room temperature with constant shaking. Avoid exposure to direct sunlight.
- K.** Immediately **read** the OD at 620 nm in a microtiter plate photometer.

Option If the laboratory does not have access to a microtiter plate reader capable of reading at 620 nm, the OD can be determined in this way: Add 100 µL of Stop Solution, mix and read the OD at 405 nm in a microtiter plate photometer within 15 min after addition of Stop Solution.

10.0 CALCULATION OF RESULTS

10.1 VALIDITY OF THE ASSAY

Control 1 and 2 may be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial labels. If values outside of the specified range are obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the analysis repeated.

10.2 QUALITY CONTROL

Each laboratory may in addition prepare its own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to assure the precision of the assay.

If the results should fall out with the expected range, repeat the assay using freshly prepared controls. If the results continue to fall outside the specific range, and after equipment, adherence to the protocol and laboratory

procedure have been verified, seek assistance from the supplier. Do not report patient results if the control results fall out with the acceptable ranges.

10.3 DATA REDUCTION: AUTOMATED METHOD

If a microtiter plate photometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the photometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the CA19-9 calibrators.

For automatic calculation of CA19-9 results it is recommended to use either of the following methods:

- **Cubic spline** curve fit method. Calibrator 0 should be included in the curve with the value 0 U/mL.
- **Spline smoothed curve** fit method. Calibrator 0 should be used as plate blank.
- **Interpolation with point-to-point evaluation.** Calibrator 0 should be included in the curve with the value 0 U/mL.
- **Quadratic curve** fit method. Calibrator 0 should be included in the curve with the value 0 U/mL.

NOTE: 4-parametric or linear regression should not be used.

10.4 DATA REDUCTION: MANUAL METHOD

A calibration curve is constructed by plotting the OD values obtained for each Calibrator against the corresponding CA19-9 concentration (in U/mL), see figure below. The unknown CA19-9 concentrations can then be read from the calibration curve using the mean OD value of each patient specimen.

10.5 MEASUREMENT RANGE

The EIAgen Gi MARKER CA19-9 kit measures concentrations between 1 and 240 U/mL. If CA19-9 concentrations above the measuring range are to be expected, it is recommended to dilute samples with the Calibrator 0 prior to analysis.

If samples in an initial analysis give CA19-9 levels higher than 240 U/mL the samples should be diluted 1/10 and 1/100 with CA19-9 Calibrator 0 to obtain the accurate CA19-9 concentration of the samples.

1/10 dilution = 50 µL of specimen + 450 µL of CA19-9 Calibrator 0

1/100 dilution = 50 µL of 1:10 dilution + 450 µL of CA19-9 Calibrator 0

The CA19-9 concentration of the undiluted sample is then calculated as:

Dilution 1/10= 10 x measured value

Dilution 1/100= 100 x measured value

11.0 EXPECTED VALUES

CA19-9 was measured in 100 healthy blood donors, 36 women and 64 men. The mean value obtained was 6.5 U/mL with a standard deviation of 6.4. The median value was 4.5 U/mL, range 0 – 29 U/mL. The lower and upper extremes of the normal range were examined using IFCC recommended non-parametric statistical treatment. The reference interval contains the central 95% fraction of the reference distribution. Reference limits may accordingly be estimated as the 2.5% (lower) and 97.5% (upper) fractiles. These limits cut off a fraction of 2.5% of the values in each tail of the reference distribution. Non-parametric estimates: N=100

Fraction	Reference limit (U/mL)
2.5th (lower)	0
97.5th (upper)	25

100% of the healthy subjects had assay values below 37 U/mL. It is recommended that each laboratory establish its own normal range to account for such local environmental factors as diet, climate, living conditions, patient selection, etc.

12.0 LIMITATION OF THE PROCEDURE.

The level of CA19-9 cannot be used as absolute evidence for the presence or absence of malignant disease and the CA19-9 test should not be used in cancer screening. The results of the test should be interpreted only in conjunction with other investigations and procedures in the diagnosis of disease and the management of patients, and the CA19-9 test should not replace any established clinical examination.

Benign conditions such as acute or chronic pancreatitis or cholelithiasis may cause elevated levels of CA19-9.

Patients with a Le a-/b- phenotype do not express the CA19-9 reactive epitope. Anti-reagent antibodies (human anti-mouse antibody (HAMA) or heterophilic antibodies) in the patient sample may occasionally interfere with the assay, even though specific blocking agents are included in the buffers.

13.0 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 PRECISION

Total precision was determined according to NCCLS guideline EP5-A (4) using four levels of frozen pooled human serum containing added ascitespool. Each sample was randomly pipetted (n=2/analysis) and analysed twice each day

over 20 days. The analyses were undertaken during a period of 53 months, by > three different technicians and using 20 different kit batches.

Sample	Replicates	Mean U/mL	Within-run SD (U/mL)	Within run CV %	Between day SD (U/mL)	Between day CV %
CA19-9 1	80	15.4	0.6	3.8	1.0	6.8
CA19-9 2	80	56.3	1.9	3.3	3.6	6.3
CA19-9 3	80	99.8	4.5	4.5	6.2	6.2
CA19-9 4	80	182	7.9	4.4	12	7.0

13.2 DETECTION LIMIT

The detection limit of the ADALTIS CA19-9 EIA assay is < 1 U/mL defined as the concentration corresponding to the mean of the OD values for the Calibrator 0 plus 2 standard deviations according to the formula:

$$(2 \times \text{SD CAL 0}) / (\text{OD CAL 1} - \text{OD CAL 0}) \times 15 \text{ U/ml}$$

13.3 RECOVERY

Spiked serum samples were prepared by adding different levels of human CA19-9 antigen to normal serum samples. The recovery of the antigen was in the range 90–110%.

13.4 HOOK EFFECT

No hook effect has been noticed with samples up to 50 000 U/mL.

NOTE: In very high samples the colour of the substrate will change from blue to greenish (and eventually yellow in extremely high samples). This will lead to a falsely low OD at 620 nm, and in extreme cases the OD may fall within the calibration curve range and noticed as a hook.

13.5 LINEARITY

Eight patient samples were serially diluted with Calibrator 0 and analyzed. The obtained values were between 96-105 % of the expected values in the range 10–200 U/mL.

13.6 SPECIFICITY

The monoclonal antibody used (C192) is highly specific for the sialyl Lewis^a epitope (1). The NCCLS guideline EP7-P (5) was followed to determine possible sources of interference. The following substances and concentrations were tested and found not to interfere with the test.

	Concentration with no significant (± 10%) interference
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubin, unconjugated	0.6 mg/mL
Hemoglobin	5 mg/mL

14.0 AUTOMATION

Application protocols for the proper automation on the Adaltis microtiterstrips analyzers are available upon request at Adaltis directly.

15.0 SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors .

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different (± 50%) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> - incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation) - error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) - contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> - not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) - contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers) - pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)
no colourimetric reaction after addition of substrate	<ul style="list-style-type: none"> - some reagent not pipetted strong contamination of conjugate or Substrate - errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> - incorrect conjugate dilution - incubation time too short, incubation temperature too low
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> - incorrect conjugate dilution - incubation time too long, incubation temperature too high - water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization) - insufficient washing (conjugates not properly removed)
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> - contamination of pipettes, tips or containers - inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> - reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temp. prior to use - plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> - incubation conditions not constant (time, temperature) - controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order) - person-related variation

16.0 REFERENCES

1. Rye P. D. et al., (1998) Summary report on the ISOBM TD-6 workshop: Analysis of 20 monoclonal antibodies against Sialyl Lewis^a and related antigens. Montreaux, Switzerland; September 19-24 1997. *Tumor Biol.* 19: 390-420.
2. Eskelinen M., and Haglund U. (1999) Developments in serologic detection of human pancreatic adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 34: 833-844.
3. Hammarström S., and Stigbrand T. (2002) Gastric Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACCC Press, Washington pp 375-379.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999)
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)

EIAgen GI Marker CA 19-9 Kit

REF LI 4040



96 tests

Adaltis Italia S.p.A.
Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Tel. +39-051-6136511 – Fax +39-051-575280
www.adaltis.com








SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO



Conservare a 2...8 °C

it

SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE

MTPLATE	micropiastra
CONJ HRP 20x	coniugato HRP concentrato
BIOTIN Anti-CA19-9	Anti-CA 19-9 Biotina
DIL CONJ	diluyente del coniugato
CAL0	Calibratore 0
CAL1	Calibratore 1
CAL2	Calibratore 2
CAL3	Calibratore 3
CAL4	Calibratore 4
CAL5	Calibratore 5
CONTROL1 CONTROL2	Controlli
SOLN TMB	substrato TMB
SOLN STOP	soluzione bloccante
WASH BUF 25X	soluzione di lavaggio concentrata
LOT	numero di lotto
REF	codice catalogo
	data di scadenza
 2°C  8°C	limitazioni di temperatura (conservare a 2...8°C)
	numero di determinazioni
	proteggere dalla luce solare
	Fabbricato da
	Attenzione, leggere attentamente le istruzioni per l'uso

IVD solo per uso diagnostico in vitro



Rischio biologico (ved. Sezione.7 avvertenze e precauzioni)

1.0 FINALITÀ DEL TEST

Il kit EIAgen GI-Marker CA 19-9 consente la determinazione quantitativa in siero umano dell'antigene CA 19-9 associato al carcinoma gastro-intestinale.

2.0 INTRODUZIONE E SPEIGAZIONE DEL TEST

Il kit EIAgen GI-Marker CA 19-9 utilizza un anticorpo monoclonale murino, C192, altamente specifico per l'epitopo sialico Lewis^a, noto anche come antigene CA 19-9 (1). Negli adulti l'epitopo è tipicamente presente in tracce sulle cellule mucose dell'epitelio gastrointestinale. Nei pazienti con patologia maligna l'epitopo può trovarsi nel sangue associato a mucine ad alto peso molecolare. Il dosaggio di CA 19-9, viene usato frequentemente per monitorare patologie maligne gastrointestinali come i tumori del pancreas, della cistifellea, dello stomaco e colon retti (2,3).

3.0 PRINCIPIO DEL TEST

EIAgen GI-Marker CA 19-9 è un dosaggio non competitivo in fase solida basato sul principio sandwich diretto. Calibratori, controlli e campioni sono incubati con un anticorpo monoclonale murino biotinilato anti-CA19-9 Mab C192, in una micropiastra sensibilizzata con Streptavidina. L'antigene CA19-9 presente nei calibratori/campioni durante l'incubazione è adsorbito dalla Streptavidina tramite la porzione biotinilata dell'anticorpo monoclonale anti- CA19-9. Ai lavaggi segue un'incubazione con Anti-CA19-9 marcato con HRP(perossidasi) MAb C192. Ulteriori lavaggi precedono l'aggiunta del Substrato/ Cromogeno (perossido d'idrogeno e 3,3',5,5' tetra-metilbenzidina). Durante la reazione enzimatica si sviluppa una colorazione blu che indica la presenza dell'antigene. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di CA19-9 presente nei campioni. L'assorbanza (OD) è misurata in uno fotometro a 620 nm (oppure a 405 nm dopo l'aggiunta della soluzione bloccante). Per ogni dosaggio si costruisce una curva di calibrazione delle OD contro le rispettive concentrazioni di ogni calibratore. La concentrazione di CA19-9 di ogni campione si ricava quindi per interpolazione sulla curva di calibrazione.

4.0 COMPOSIZIONE DEL KIT

4.1 MICROPIASTRA (codice 35PIA)

MTPLATE

1 micropiastra pronta all'uso 12x8 pozzetti sensibilizzate con Streptavidina. Conservare la micropiastra nella confezione chiusa e in presenza dell'essiccante. Proteggere dall'umidità.

4.2 CONIUGATO (codice 35HRP)

CONJ|HRP|20X

1 flacone contenente 0.75 mL di soluzione concentrata 20X Anti-CA19-9 (anticorpo monoclonale di origine murina) coniugato con HRP (conc.= 40 µg/mL). Contiene conservanti.

Diluire con il Diluyente del coniugato prima dell'uso.

Preparazione della soluzione di lavoro del Coniugato: preparare la quantità necessaria di soluzione diluita del coniugato mescolando 50µl di coniugato concentrato con 1 mL di diluyente del coniugato per ogni strip (vedere la tabella sottostante:

N° di strips	CONIUGATO HRP anti CA19-9 µl	Diluyente del Coniugato mL
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Assicurarsi di usare un contenitore di plastica pulita od un flacone di vetro per preparare la soluzione di lavoro del Coniugato.

Alternativa: versare il contenuto del flacone contenente il Coniugato concentrato nel flacone contenente il Diluyente del Coniugato e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del Coniugato concentrato venga trasferito nel flacone del Diluyente del Coniugato.

CONSERVAZIONE: la soluzione di lavoro del coniugato è stabile per 3 settimane a 2–8°C in un contenitore sigillato. Non preparare più soluzione di quanto possa essere utilizzata in 3 settimane.

4.3 DILUYENTE DEL CONIUGATO (codice 35HRPD)

DIL|CONJ

1 flacone contenente 15 mL di tampone fosfato-citrato (pH 7.5), con albumina sierica bovina, globulina bovina, agenti bloccanti, Tween 40, colorante blu inerte, e 0.01% MIT (metil isotiazolone) come conservante.

Pronto all'uso.

4.4 CALIBRATORI

6 flaconi da 0.75 mL (tranne il calibratore 0; 8 mL). I calibratori contengono l'antigene CA 19-9 in una soluzione tampone salina Tris-HCl, con albumina sierica, un colorante inerte giallo e sodio azide 0.05 % come conservante. Le concentrazioni sono :

Calibratori	symbol	code	concentration
Calibratore 0	CAL0	35 CAL0	0 U/mL
Calibratore 1	CAL1	35CAL1	15 U/mL
Calibratore 2	CAL2	35CAL2	30 U/mL
Calibratore 3	CAL3	35CAL3	60 U/mL
Calibratore 4	CAL4	35CAL4	120 U/mL
Calibratore 5	CAL5	35CAL5	240 U/mL

Pronti all'uso.

NOTA: Utilizzare il Calibratore 0 come diluente campioni.

Materiale di riferimento. Dal momento che non è disponibile materiale di riferimento per l'antigene CA19-9, i valori di concentrazione dei calibratori sono assegnati contro un set di calibratori di riferimento interni.

4.5 Anti CA 19-9 BIOTINA (code 35BT) BIOTIN|Anti-CA19-9

1 flacone da 15 mL contenente l'anticorpo monoclonale murino Anti-CA19-9 biotinilato (conc. ≈ 2 µg/mL). Contiene un tampone fosfato citrato (pH 7.5) con albumina sierica bovina, agenti bloccanti, Tween 40, colorante rosso inerte, e MIT 0.01% come conservante.

Pronto all'uso.

4.6 CONTROLLI

Controlli	simbolo	codice	
Control 1	CONTROL1	35 CTRL1	1 flacone da 0.75 mL
Control 2	CONTROL2	35 CTRL2	1 flacone da 0.75 mL

Ciascun controllo contiene l'antigene CA 19-9 conservato in tampone tris-HCL contenente albumina sierica bovina e sodio azide 0.05% come conservante. Pronti per l'uso.

4.7 SUBSTRATO TMB (codice TMBB) SOLN|TMB

1 flacone contenente 12 mL di perossido di idrogeno e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB).

Pronto all'uso.

4.8 SOLUZIONE BLOCCANTE (codice STOPB) SOLN|STOP

1 contenente 15 mL of acido cloridrico 0.12M.

Pronto all'uso.

4.9 SOLUZIONE DI LAVAGGIO 25X (codice TLAVB)

WASH|BUF|25X

1 flacone (50 mL) contenente una soluzione tampone salina Tris-HCl con Tween 20. Contiene German II come conservante. Concentrato 25X.

Diluire il contenuto del flacone fino a 1250 mL con acqua distillata prima dell'uso.

Preparazione della soluzione di lavaggio diluita: versare 50 mL di soluzione di lavaggio concentrata in un contenitore pulito e diluire 25 volte aggiungendo 1200 mL di con acqua distillata o deionizzata. Mescolare bene prima dell'uso.

CONSERVAZIONE: conservare questa soluzione a 2...8° C se non viene utilizzata immediatamente. La soluzione diluita è stabile a 2...25° C per 2 settimane in un contenitore sigillato.

5.0 CONSERVAZIONE E STABILITÀ DOPO PRIMA APERTURA

- Conservare i componenti del kit a 2...8°C; non utilizzare dopo la data di scadenza indicata.
- Dopo l'utilizzo conservare la micropiastre nella sua confezione e chiudere bene i flaconi con i rispettivi tappi. Conservare il kit a 2...8°C
- Il kit una volta aperto deve essere utilizzato entro la data di scadenza riportata sulle etichette.

6.0 MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI NON FORNITI NEL KIT

- Agitatore per micropiastre:** l'agitazione dovrebbe essere tra il medio e il vigoroso; l'agitazione longitudinale deve essere tarata sulle 200 strokes/min, e 700—900 oscillazioni /min.
- Lavatore di micropiastre:** lavatore automatico di micropiastre in grado di eseguire 1, 3 and 6 cicli di lavaggio, lavatore di micropiastre semi automatico collegato con una pompa a vuoto con contenitore per i liquidi aspirati. Si

consiglia il lavatore di strip manuale Nunc immuno-8 nel caso che un lavatore di micropiastre automatico non sia disponibile.

- Fotometro per micropiastre:** lettore fotometrico con filtro a 620 nm e/o 405 nm ed in grado di leggere le OD in un intervallo da 0 a 3.0.
- Pipette di precisione:** con puntali di plastica monouso in grado di dispensare in modo preciso volumi di microlitri. Utili, ma non indispensabili, per dispensare volumi di 100 µl sono le pipette a 8 canali o le pipette graduate con puntali di plastica monouso. Sono necessarie anche delle pipette in grado di dispensare volumi dell'ordine del millilitro.
- Acqua distillata o deionizzata :** per la preparazione della soluzione di lavaggio.
- Altro:** Porta reattivi per pipette multi-canale, carta assorbente, timer.

7.0 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

7.1 NORME DI SICUREZZA

- Tutti i reagenti in questo kit sono per uso diagnostico in vitro.
- Si raccomanda l'utilizzo di questo kit solo da parte di personale con esperienza e nel rispetto delle Norme di Buona Pratica di Laboratorio (GLP). Gli operatori devono indossare guanti ed abiti protettivi nel manopolazione dei sieri dei pazienti e dei prodotti a base di siero.
- I reagenti che contengono conservanti, perossido d'idrogeno, acido cloridrico possono essere tossici se ingeriti. Non pipettare con la bocca. Evitare il contatto dei reagenti o dei campioni con pelle e mucose. In caso di contatto, sciacquare abbondantemente con acqua. Evitare gli schizzi e la dispersione nell'aria.
- Lavare accuratamente la vetreria riutilizzabile e asciugarla in modo da eliminare ogni traccia di sapone.
- I materiali di origine umana usati per la preparazione di alcuni reagenti sono stati testati per controllare la presenza di Anticorpi contro il Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV 1 e 2) , e la presenza dell'Antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) e dell'Antigene dell'Epatite C e sono risultati negativi. Tutti i materiali sono stati analizzati con saggi approvati da FDA. Tuttavia, dal momento che nessun metodo può offrire completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, si raccomanda di manipolare tutti il prodotti contenenti materiale di origine umana con le stesse precauzioni utilizzate per i campioni dei pazienti.
- Eseguire lo smaltimento dei rifiuti seguendo le disposizioni e le leggi vigenti. Durante l'eliminazione dei reagenti contenenti sodio azide porre attenzione al fatto che la sodio azide può formare composti esplosivi a contatto prolungato con piombo e rame.

7.2 PRECAUZIONI TECNICHE

A. Utilizzo corretto dei reagenti

- Le prestazioni qui riportate sono state ottenute impiegando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso. Non usare i reagenti provenienti da kit di altri produttori.
- Non utilizzare reagenti provenienti da altri kit EIAgen. Non usare reagenti provenienti da lotti diversi di kit.
- Non diluire o modificare i reagenti del kit, a meno che non sia descritto in questa metodica.
- il Substrato TMB può essere contaminato molto facilmente. Se ciò accidentalmente avviene diventa blu, in tal caso non usarlo e scartarlo.. Per una stabilità ottimale del Substrato, versare la quantità necessaria in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso.

B. Precauzioni per una corretta procedura di pipettamento

- Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso ed usare una appropriata tecnica di pipettamento nel manipolare campioni e reattivi. Evitare la contaminazione del reattivo tenendo il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido.
- Una appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggia il Substrato TMB.

C. Precauzioni per una corretta procedura di lavaggio

- Il pre-lavaggio delle strips è essenziale.
- Il lavaggio della micropiastre è un passaggio critico. Pozzetti non correttamente lavati possono causare risultati falsati del test.
- PROCEDURA DI LAVAGGIO:** una attenta procedura di lavaggio delle strips è essenziale. Assicurarsi che ogni pozzetto sia completamente riempito fino al bordo superiore e che l'aspirazione del liquido nei pozzetti fra un lavaggio e l'altro ed alla fine dei lavaggi sia completa in modo tale che i pozzetti siano completamente asciutti. In caso rimanga del liquido residuo nei pozzetti capovolgere la micropiastre, premendola attentamente sulla carta assorbente.
- Lavaggio automatico:** seguire le istruzioni del produttore per la manutenzione dello strumento usato ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. I sistemi di lavaggio ed aspirazione non devono essere lasciati per lunghi periodi a contatto con la soluzione di lavaggio in quanto gli ugelli potrebbero intasarsi compromettendo le operazioni di dispensazione.

leggere l'assorbanza (OD) a 405 nm entro 15 min dall'aggiunta del reattivo bloccante.

D. Conformità alla procedura e alle specifiche

- Il protocollo del saggio deve essere seguito strettamente. Rispettare i tempi, la temperatura di incubazione e la procedura di lavaggio: questi passaggi sono critici. Non lasciare seccare i pozzetti fra un'incubazione e l'altra. Leggere attentamente la sezione 9.0_PROCEDURA DEL SAGGIO
- Includere sempre il controllo positivo e negativo in ogni seduta analitica per controllare la stabilità dei reagenti e la corretta esecuzione del saggio. I valori ottenuti di OD dei calibratori e di concentrazione dei controlli, per la loro accettabilità, devono essere sempre confrontati con quelli riportati nel certificato di analisi. Leggere anche le sezioni 10.1_VALIDITÀ DEL SAGGIO E 10.2_CONTROLLO DI QUALITÀ.
- Non usare il kit per la determinazione di valori al di fuori del *range* indicato nelle istruzioni per l'uso. Leggere sezione 10.5_INTERVALLO DI MISURA.

8.0 RACCOLTA DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE

- Il kit richiede l'utilizzo di siero.
- Prelevare il sangue per via venosa e separare il siero seguendo la normale procedura.
- I campioni possono essere conservati a 2-8°C per 24 ore. Congelare i campioni a -70°C se i tempi di conservazione sono più lunghi.
- I campioni non devono essere conservati in un congelatore a congelamento automatico.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.
- Scongelerare i campioni lentamente, preferibilmente in frigorifero a 2-8°C durante la notte.

9.0 PROCEDURA DEL TEST

9. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (20...25°C). Per dare risultati attendibili il saggio deve essere eseguito a temperatura tra 20-25°C.
- Preparare la soluzione di lavaggio diluita (par.4.9) e la soluzione diluita del coniugato (par.4.2).
- Assicurarsi di aver preparato un numero sufficiente di pozzetti. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto (riporre le restanti strips nella busta di alluminio contenente una sostanza disidratante e sigillare).
- Prima di dispensare i calibratori ed i campioni è consigliabile segnare le strips in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio;
- Si raccomanda di eseguire la determinazione dei campioni in duplicato. Includere sempre la curva di calibrazione in ogni seduta in duplicato.

9.2 PROCEDURA DI ESECUZIONE DEL SAGGIO

- Lavare** le strips una volta con la soluzione di lavaggio diluita. Non lavare un numero maggiore di strips rispetto a quelle che possono essere usate entro 30 min.
- Dispensare** in duplicato 25 µL di ogni calibratore (CAL 0, 1, 2, 3, 4, 5), dei controlli (C1 e C2, e dei campioni nei pozzetti);
- Dispensare** 100 µL di Biotin- Anti CA19-9 in ogni pozzetto usando la pipetta di precisione da 100 µl (o una pipetta di precisione a 8 canali). Evitare la contaminazione mantenendo il puntale leggermente al di sopra del bordo del pozzetto senza toccare la plastica o la superficie del liquido.
- Incubare** per 2 ore (± 5 min) a temperatura ambiente in costante agitazione usando un agitatore di micropiastre.
- Dopo la prima incubazione, **aspirare** la soluzione di incubazione e **lavare** 3 volte i pozzetti con la soluzione di lavaggio.seguendo il procedimento di lavaggio descritto al punto 7.2C
- Dispensare** 100 µl di soluzione di lavoro del coniugato in ogni pozzetto, usare la stessa procedura di pipettamento descritta al punto C;
- Incubare** 1 ora (± 5 min) a temperatura ambiente in costante agitazione;
- Dopo la seconda incubazione **lavare** 6 volte seguendo il procedimento di lavaggio descritto al punto 7.2C ;
- Dispensare** 100 µl di Substrato TMB in ogni pozzetto; usare la stessa procedura di pipettamento descritta al punto C; il substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più in fretta possibile ed il tempo trascorso tra la dispensazione nel primo pozzetto e l'ultimo non deve superare i 5 min.
- Incubare** a temperatura ambiente per 30 minuti (± 5 min) con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce.
- Leggere** immediatamente le OD a 620 nm usando il lettore di micropiastre;

OPZIONE: se non si ha a disposizione un lettore di micropiastre in grado di leggere a 620 nm, l'assorbanza (OD) può essere determinata come di seguito : Bloccare la reazione con 100 µL di Soluzione Bloccante per pozzetto,

10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

10.1 VALIDITÀ' DEL SAGGIO

I controlli 1 e 2 devono essere usati per validare la serie analitica. L'intervallo dei valori attesi è indicato sull'etichetta dei flaconi. Se i valori ottenuti sono al di fuori dell'intervallo atteso, deve essere effettuato un controllo completo della funzionalità dei reagenti e del lettore ed il dosaggio deve essere ripetuto. Vedere anche il paragrafo 10.2.

10.2 CONTROLLO QUALITÀ'

Ogni laboratorio inoltre dovrebbe preparare il proprio pool di sieri a differenti concentrazioni che può essere usato come controllo interno per assicurarsi delle prestazioni del dosaggio.

Se i risultati sono al di fuori dell'intervallo dei valori attesi ripetere il saggio utilizzando dei controlli preparati di fresco; se i risultati continuano ad essere al di fuori dell'intervallo atteso nonostante sia stata controllata l'aderenza alla procedura e l'efficienza della strumentazione, chiedere assistenza al fornitore. In risultati ottenuti per i pazienti non devono essere refertati se i controlli interni cadono al di fuori del range di accettabilità.

10.3 ELABORAZIONE DEI DATI: METODO AUTOMATICO

Se è disponibile un lettore di micropiastre con procedimento di calcolo programmato consultarne il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore.

Per il calcolo automatico dei risultati CA 19-9 si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi.

- il metodo di *fitting* con curva *Cubic spline*. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 U/mL
- il metodo di *fitting* con curva *Spline smoothed*. Il calibratore 0 deve essere usato come bianco della micropiastre.
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 U/mL
- il metodo di *fitting* con curva *quadratica*. Il calibratore 0 deve essere incluso nella curva con valore 0 U/mL

NOTA: Non usare non usare metodi di valutazione 4 parametri logistici o di regressione lineare.

10.4 ELABORAZIONE DEI DATI: METODO MANUALE

La curva di calibrazione viene tracciata riportando su grafico I valori di OD ottenuti per ogni calibratore contro la corrispondente concentrazione di CA 19-9 espressa in U/mL.

Le concentrazioni incognite di CA 19-9 possono quindi essere ricavate dalla curva di calibrazione usando il valore medio di OD di ogni campione.

10.5 INTERVALLO DI MISURA

Il kit ElAgen GI Marker CA 19-9 misura concentrazioni tra 1 e 240 U/mL. Se si attendono concentrazioni di CA 19-9 superiori all'intervallo di misura si raccomanda di diluire i campioni con il Calibratore 0 prima di effettuare il dosaggio.

Se i campioni ad un primo dosaggio danno concentrazioni di CA 19-9 più elevate di 240 U/mL i campioni devono essere diluiti 1/10 e 1/100 con il calibratore 0 per ottenere una accurata misura della concentrazione di CA 19-9 nei campioni.

diluzione 1/10 = 50 µL campione + 450 µL di Calibratore 0

diluzione 1/100 = 50 µL della diluizione 1/10 + 450 µL di Calibratore 0

La concentrazione di CA19-9 nel campione non diluito è calcolata come riportato di seguito:

diluzione 1/10= 10 x valore misurato

diluzione 1/100= 100 x valore misurato

11.0 VALORI ATTESI

CA19-9 è stato misurato un 100 donatori sani, 36 donne e 64 uomini. Il valore medio ottenuto è stato 6.5 U/mL con una deviazione standard di 6.4. Il valore mediano è stato 4.5 U/mL, intervallo 0-29 U/mL.

Gli estremi inferiore e superiore dell'intervallo di normalità sono stati definiti usando il trattamento statistico non parametrico raccomandato da IFCC.

L'intervallo di riferimento contiene nella frazione centrale il 95% della distribuzione di riferimento.

I limiti di riferimento possono pertanto essere stimati come il 2.5 % (inferiore) ed il 97.5% (superiore) fractile. Questi limiti escludono una frazione del 2.5% dei valori di ogni coda della distribuzione di riferimento.

Stime non parametriche: N=100.

Frazione	limite di riferimento (U/mL)
2.5° (inferiore)	0
97.5° (superiore)	25

Il 100% dei soggetti sani presenta valori sotto le 37 U/mL.

Si raccomanda ad ogni laboratorio di definire il proprio intervallo di normalità per tenere conto di fattori ambientali locali come la dieta, il clima, la condizione di vita, il criterio di scelta dei pazienti, ecc.,

12.0 LIMITI DELLA PROCEDURA

La concentrazione di CA19-9 non può essere intesa come evidenza della presenza o della assenza di patologia tumorale ed il dosaggio di CA 19-9 non deve essere usato come sistema di screening per il tumore. I risultati del dosaggio devono essere interpretati solo unitamente ad altri sistemi di investigazione della diagnosi della malattia e della anamnesi del paziente ed il dosaggio di CA 19-9 non può sostituire metodi consolidati di valutazione clinica. Patologie benigne quali la pancreatite cronica o la colelitiasi possono causare livelli elevati di CA 19-9. pazienti con fenotipo Le a-/b- non esprimono l'epitopo reattivo di CA 19-9. Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti topo HAMA o anticorpi esterofili) possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifici agenti bloccanti sono contenuti nei tamponi.

13.0 CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

13.1 PRECISIONE

La precisione totale è stata determinata in accordo con linee guida NCCLS EP5-A (4) utilizzando 4 livelli di pool di sieri umani congelati con aggiunta di pool di ascite. Ogni campione è stato pipettato a caso (n=2/analisi) e testato due volte al giorno per 20 giorni. I dosaggi sono stati effettuati per un periodo di 53 mesi da almeno 3 diversi tecnici usando 20 lotti differenti di kits.

campioni	replicati	media U/mL	Intra-saggio SD (U/mL)	Intra-saggio CV %	Inter-saggio SD (U/mL)	Inter-saggio CV %
CA19-9 1	80	15.4	0.6	3.8	1.0	6.8
CA19-9 2	80	56.3	1.9	3.3	3.6	6.3
CA19-9 3	80	99.8	4.5	4.5	6.2	6.2
CA19-9 4	80	182	7.9	4.4	12	7.0

13.2 LIMITE DI RILEVAZIONE

Il limite di rilevazione del kit EIAgen CA19-9 è < 1 U/mL ed è definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di OD del Calibratore 0 più 2 deviazioni standard secondo la formula:

$$(2 \times \text{SD CAL } 0) / (\text{OD CAL } 1 - \text{OD CAL } 0) \times 15 \text{ U/mL}$$

13.3 RECUPERO

Campioni di siero sono stati preparati aggiungendo aliquote diverse di antigene umano CA19-9 a sieri normali. Il recupero dell'antigene è stato di 90-110%.

13.4 EFFETTO GANCIO

Non si è verificato nessun effetto gancio in campioni fino a 50000 U/mL.

NOTA: in campioni molto concentrati il colore del substrato potrebbe cambiare da blu a verdastro (ed eventualmente in giallo in campioni estremamente concentrati). Questo potrebbe portare ad un valore di OD a 620 nm falsamente basso e in casi estremi il valore di OD potrebbe cadere all'interno dell'intervallo della curva di calibrazione e potrebbe essere interpretato come un effetto gancio.

13.5 LINEARITÀ

Otto campioni di pazienti sono stati serialmente diluiti con il Calibratore 0 ed analizzati. Valori ottenuti erano tra 96 e 105% dei valori attesi nell'intervallo 10-200 U/mL.

13.6 SPECIFICITÀ

L'anticorpo monoclonale usato (C192) è altamente specifico per l'epitopo sialico di Lewis (1). La linea guida NCCLS EP7-P (5) è stata seguita per determinare possibili fonti di interferenza. Le seguenti sostanze sono state analizzate alle concentrazioni indicate e sono state trovante non interferenti nel saggio.

	Concentrazione con interferenza non significativa (± 10%)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirubina libera	0.6 mg/mL
Emoglobina	5 mg/mL

14.0 AUTOMAZIONE

I protocolli di applicazione per una corretta automazione sugli analizzatori Adaltis sono disponibili su richiesta diretta ad Adaltis.

15.0 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione possono evitare i seguenti tipi di errori.

ERRORE	POSSIBILI CAUSE e SUGGERIMENTI
OD molto diverse (± 50%) da quelle riportate nel QC	<ul style="list-style-type: none"> errato volume di dispensazione dei campioni o dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente) errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare all'inizio dell'incubazione) errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) contaminazione del Substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti)
Risultati poco riproducibili	<ul style="list-style-type: none"> volume di dispensazione dei reagenti e campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio, nel caso tararle nuovamente) errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) contaminazione del Substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti) inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimenti: utilizzare puntali appropriati, contenitori per il travaso dei reagenti, monouso adatti e acqua distillata o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato.	<ul style="list-style-type: none"> alcuni reagenti non sono stati dispensati forte contaminazione del coniugato o del Substrato Errata sequenza di esecuzione (es. dispensazione accidentale di reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato)
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	<ul style="list-style-type: none"> coniugati non diluiti correttamente tempo di incubazione troppo breve, temperature di incubazione troppo bassa
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	<ul style="list-style-type: none"> coniugati non diluiti correttamente tempo di incubazione troppo lungo o temperatura di incubazione troppo alta,- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) lavaggio non efficiente (coniugato non propriamente rimosso)
Inspiegabile risultati aberranti	<ul style="list-style-type: none"> contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori lavaggio incostante e insufficiente (coniugato non propriamente rimosso)
CV% intrasaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
CV% intersaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperature) controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli; (suggerimento: controllare la sequenza di dispensazione) variabilità intrinseca degli operatori

16.0 RIFERIMENTI

- Rye P. D. et al., (1998) Summary report on the ISOBM TD-6 workshop: Analysis of 20 monoclonal antibodies against Sialyl Lewis x and related antigens. Montreux, Switzerland; September 19-24 1997. *Tumor Biol.* 19: 390-420.
- Eskelinen M., and Haglund U. (1999) Developments in serologic detection of human pancreatic adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 34: 833-844.
- Hammarström S., and Stigbrand T. (2002) Gastric Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACC Press, Washington pp 375-379.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999)
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)



Riscos Biológicos (Consultar SECÇÃO 7 – Advertências Precauções).

EIAgen GI Marker CA 19-9 Kit

REF LI4040

 96 testes







Adaltis Italia S.p.A.
Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (Bologna) Itália
Tel.: +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280
www.adaltis.com

APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO 

Conservar a 2...8°C

Pt

SÍMBOLOS USADOS NOS RÓTULOS

MTPLATE	Microplaca
CONJ HRP 20x	Conjugado HRP concentrado
BIOTIN Anti-CA19-9	Biotina Anti-PSA 19-9
DIL CONJ	Diluyente de conjugado
CAL0	Calibrador 0
CAL1	Calibrador 1
CAL2	Calibrador 2
CAL3	Calibrador 3
CAL4	Calibrador 4
CAL5	Calibrador 5
CONTROL1 CONTROL2	Controlos
SOLN TMB	Substrato TMB
SOLN STOP	Solução de Paragem
WASH BUF 25X	Tampão de lavagem concentrado
LOT	Número de lote
REF	Código de catálogo
	Prazo de validade (Usar até...)
2°C  8°C	Limite de temperatura (conservar a 2...8°C)
	Número de testes
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Fabricado por
	Atenção, consulte as instruções de utilização
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (uso diagnóstico in vitro)

1.0 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O EIAgen GI Marker CA19-9 é um kit para a determinação quantitativa do antígeno CA19-9 associado ao cancro no soro humano.

2.0 RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O kit EIAgen GI Marker CA19-9 tem por base um anticorpo monoclonal de rato – C192 –, altamente específico para o epítipo sialil Lewis^a, também conhecido por antígeno CA19-9 (1). Nos adultos, o epítipo é tipicamente expresso em quantidades mínimas nas células mucosas de epitélios gastrointestinais.

Em doentes com doença maligna, o epítipo pode aparecer no sangue associado com uma mucina de peso molecular elevado. Os ensaios para a CA19-9 são frequentemente usados para monitorizar as malignidades gastrointestinais, como os cancros pancreáticos, da vesícula biliar, gástricos e colorectais (2,3).

3.0 PRINCÍPIO DO TESTE

O kit EIAgen GI Marker CA19-9 é um imunoenensaio não competitivo, de fase sólida, baseado na técnica de sandwich directa. Os calibradores, os controlos e as amostras dos doentes são incubados juntamente com o anticorpo monoclonal anti-CA19-9 biotinilado (Mab) – C192 (derivado de rato) - em tiras de microtítulos cobertas com Estreptavidina. O CA19-9 presente nos calibradores ou amostras é adsorvido, durante a incubação, para as tiras de microtítulos cobertas com estreptavidina, pelo Mab Anti-CA19-9 biotinilado. As tiras são posteriormente lavadas e incubadas com o Mab C192 anti-CA19-9 marcado com HRP (peroxidase de armorácio). Após a lavagem, é adicionado a cada um dos poços o substrato/cromogénio (peróxido de hidrogénio e 3, 3', 5, 5' tetra - metilbenzidina) tamponado, ocorrendo de seguida a reacção enzimática. Durante a reacção enzimática desenvolve-se uma coloração azul na presença do antígeno. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de CA19-9 presente nas amostras. A intensidade da cor é determinada num espectrofotómetro de placas de microtitulação a 620 nm. Em alternativa, a cor passa a amarelo após a adição da solução de paragem e pode ser lida a 405 nm.

As curvas de calibração são construídas para cada ensaio desenhando o valor da densidade óptica (D.O.) versus a concentração de cada calibrador. As concentrações de CA19-9 das amostras do paciente são, então, lidas a partir da curva de calibração.

4.0 CONTEÚDO DO KIT

4.1 MICROPLACA (código 35PIA)

MTPLATE

1 microplaca com 12 tiras de 8 poços divisíveis. Os poços são cobertos com estreptavidina. Após a abertura, coloque imediatamente as tiras não utilizadas dentro da embalagem de alumínio, que contém dessecante. Volte a selar a embalagem para manter as tiras secas.

4.2 CONJUGADO (código 35HRP)

CONJ|HRP|20X

1 frasco com 0,75 ml de solução Stock (concentrada 20x) ou HRP conjugado com anticorpo monoclonal anti-CA19-9 de rato (aproximadamente 40 µg/mL). Contém conservantes.

Para ser diluído com o Diluyente de Conjugado antes da sua utilização.

Preparação da solução de trabalho de conjugado (HRP- Anti-CA19-9): Prepare a quantidade requerida de solução de trabalho de conjugado, misturando 50 µL de conjugado concentrado 20 x com 1 ml de diluyente de conjugado por tira (ver tabela abaixo).

Nº de tiras	CONJUGADO	Diluyente de conjugado (ml)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Para assegurar a estabilidade, utilize um frasco de plástico ou vidro limpo, para preparação da solução de trabalho de conjugado.

Alternativa: Introduza o conteúdo do conjugado concentrado 20 x no frasco que contém diluyente de conjugado e misture suavemente. Certifique-se de que todo o conjugado concentrado 20 x é transferido para dentro do frasco de diluyente de conjugado.

CONSERVAÇÃO: a solução de trabalho de conjugado é estável durante 3 semanas a 2–8°C, num recipiente selado. Não prepare mais solução de

trabalho de conjugado do que a quantidade que usará durante este período e certifique-se de que esta é conservada adequadamente.

4.3 DILUENTE DE CONJUGADO (código 35HRPD) **DIL|CONJ**

1 frasco de 15 ml com tampão citrato-fosfato (pH 7,5), albumina de soro bovino, agentes bloqueadores, Tween 40, um corante azul inerte e 0,01 % de metilisotiazolona (MIT), como conservante.

Pronto a usar.

4.4 CALIBRADORES

6 frascos de 0,75 ml (excepto calibrador 0: 8ml). Os calibradores contêm antigénio CA19-9 numa solução salina com tampão Tris-HCl, contendo albumina de soro bovino, um corante amarelo inerte e 0,05% de azida de sódio, como conservante. Pronto a usar. As concentrações atribuídas aos calibradores são:

Calibrador	Símbolo	Código	Concentração
Calibrador 0	CAL0	35CAL0	0 U/mL
Calibrador 1	CAL1	35CAL1	15 U/mL
Calibrador 2	CAL2	35CAL2	30 U/mL
Calibrador 3	CAL3	35CAL3	60 U/mL
Calibrador 4	CAL4	35CAL4	120 U/mL
Calibrador 5	CAL5	35CAL5	240 U/mL

O calibrador 0 também deve ser usado para diluição de amostras, como Diluente de Amostras.

4.5 Biotina Anti CA 19-9

Dado que não se encontra disponível nenhum material de referência sobre o antigénio CA19-9, os valores do calibrador CA19-9 EIA da ADALTI foram atribuídos contra um conjunto de padrões de referência internos.

4.5 Biotina Anti CA 19-9 (código 35BT) **BIOTIN|Anti-CA19-9**

1 frasco com 15 ml de anticorpo monoclonal anti-CA19-9, de rato, marcado com Biotina (aproximadamente 2 µg/ml). Contém tampão citrato-fosfato (pH 7,5), albumina de soro bovino, agentes bloqueadores, Tween 40, um corante vermelho inerte e 0,01 % de metilisotiazolona (MIT), como conservante.

Pronto a usar.

4.6 CONTROLOS

Controlo	Símbolo	Código	
Controlo 1	CONTROL1	35CTRL1	1 frasco de 0,75 mL
Controlo 2	CONTROL2	35CTRL2	1 frasco de 0,75 mL

1 frasco de cada um dos controlos contendo 0,75 ml de antigénio CA 19-9 numa solução salina com tampão Tris-HCl, com albumina de soro bovino e 0,05% de azida de sódio, como conservante.

Pronto a usar.

4.7 SUBSTRATO TMB (código TMBB) **SOLN|TMB**

Um frasco com 12 ml de peróxido de hidrogénio e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) pronto a usar.

Pronto a usar.

4.8 SOLUÇÃO DE PARAGEM (código STOPB) **SOLN|STOP**

1 frasco de 15 ml de 0,12 M de ácido clorídrico.

Pronto a usar.

4.9 TAMPÃO DE LAVAGEM 25X (código TLAVB) **WASH|BUF|25X**

1 frasco com 50 ml de concentrado de tampão de lavagem. O concentrado de tampão de lavagem contém uma solução salina de tampão Tris-HCl com Tween 20. Contém German II como conservante.

Preparação da solução de trabalho de Tampão de Lavagem: Introduza 50 ml de concentrado de Tampão de Lavagem num recipiente limpo e dilua-o 25 vezes adicionando 1200 ml de água destilada ou desionizada para obter uma solução de trabalho de Tampão de Lavagem.

CONSERVAÇÃO: a solução de trabalho de tampão de lavagem diluído é estável durante 2 semanas a 2-25°C, num recipiente selado.

5.0 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

- Conserve os componentes do kit a 2-8°C e não os utilize após a data de expiração do prazo de validade indicada.

- Após a utilização, deve selar novamente a microplaca, colocar e apertar devidamente as tampas dos frascos e conservar o kit a 2-8°C.

Os kits abertos devem ser usados dentro do prazo de validade indicado no rótulo.

6.0 MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- **Agitador de placa de microtítulos:** A vibração deve ser de intensidade média a vigorosa. Vibração longitudinal – aproximadamente 200 trepidações/minuto, oscilações 700-900/minuto.
- **Dispositivo de lavagem da placa de microtítulos:** Lavador de placa automático capaz de realizar 1,3 e 6 ciclos de lavagem, ou dispositivo de lavagem de placa de microtítulos semi-manual ligado a bomba de aspiração ou aspiração por jacto de água e um filtro de líquidos para reter o líquido aspirado. O sistema de lavagem manual de tiras Nunc Immuno-8 é recomendado se não estiver a ser utilizado um dispositivo de lavagem automático de placas de microtítulos.
- **Espectrofotómetro de placa de microtítulos:** com um comprimento de onda de 620 nm e/ou 405 nm e um intervalo de D.O. entre 0 e 3.0.
- **Micropipetas de precisão:** com pontas de plástico descartáveis para distribuição de microlitros. É útil, mas não essencial, a utilização de uma pipeta de 8 canais ou pipeta distribuidora com pontas de plástico descartáveis para distribuição de 100 µL. Pipetas para distribuição de mililitros.
- **Água destilada ou desionizada:** Para preparação da Solução de Lavagem.
- **Outros:** reservatórios de reagentes para pipetas de multicanais, toalhas de papel e temporizador.

7.0 ADVERTÊNCIAS OU PRECAUÇÕES

7.1 PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

- Todos os reagentes deste kit destinam-se apenas a um uso diagnóstico "in vitro".
- Este teste apenas deverá ser utilizado por pessoal laboratorial experiente, devendo o manuseamento estar em conformidade com as boas práticas de laboratório.
- Os operadores deverão utilizar luvas e vestuário de protecção quando manusearem soros de pacientes ou produtos à base de soro.
- Evitar o contacto com reagentes que contenham peróxido de hidrogénio, ácido clorídrico e conservantes que podem ser tóxicos, se ingeridos. Não utilizar a boca na pipetagem. Evite o contacto de reagentes ou amostras de pacientes com a pele ou as membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afectada com grandes quantidades de água. Evite os salpicos ou a criação de aerossóis. O material de vidro reutilizável deve ser devidamente lavado e enxaguado de modo a eliminar todos os detergentes.
- Os materiais utilizados na preparação de reagentes de origem humana foram testados e dados como negativos no que concerne à presença de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV 1 e 2), bem como no que diz respeito ao Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg) e HCV. Todo o material foi testado com métodos aprovados pela FDA. Dado que nenhuma metodologia de teste pode assegurar por completo a ausência do HIV, HBsAg ou de outros agentes infecciosos, recomenda-se que os produtos à base de soro humano sejam manuseados com as mesmas precauções habitualmente requeridas para as amostras de pacientes.
- Seguir os regulamentos locais, estaduais e nacionais no que respeita a eliminação de todos os resíduos. Para eliminar os reagentes que contêm azida, efectue as descargas com grandes quantidades de água. Elimine-os com a devida cautela, pois a azida de sódio pode formar compostos explosivos após um contacto prolongado com o cobre ou o chumbo das canalizações.

7.2 PRECAUÇÕES TÉCNICAS

A. Utilização correcta dos reagentes.

- Os dados de desempenho aqui apresentados foram obtidos mediante a utilização de reagentes específicos indicados no folheto da embalagem. Não utilize reagentes de outros fabricantes nos kits.
- Não utilize reagentes de outros kits EIAgen com este kit. Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Não dilua nem adultere os reagentes do kit, a menos que o protocolo do kit assim o exija.
- O **Substrato TMB** é muito sensível a contaminação. O substrato TMB deve ser incolor ou ligeiramente azulado. Uma cor azul indica que o reagente foi contaminado e deve ser eliminado. Para a estabilidade óptima do Substrato TMB, passe a quantidade necessária do frasco para um recipiente cuidadosamente limpo ou, preferencialmente, para um tabuleiro de plástico descartável, para evitar a contaminação do reagente. Certifique-se de que está a utilizar pontas de plástico descartável para pipetas (ou pontas de pipeta distribuidora).

B. Procedimento de pipetagem correcto.

- Certifique-se de que está a utilizar pontas de pipetas de plástico descartável limpas e uma técnica de pipetagem adequada, quando manusear as amostras e os reagentes. Evite fenómenos de "carry-over" segurando a ponta da pipeta ligeiramente acima do topo do poço e evite tocar na tira de plástico ou na superfície do líquido. Uma técnica de pipetagem adequada é de particular importância quando manusear o substrato TMB HRP.

C. Procedimento de lavagem correcto.

- Efectue a pré-lavagem das tiras antes do ensaio ser necessário.
- A lavagem das microplacas é extremamente importante. Poços mal lavados originam resultados erróneos.
PROCEDIMENTO DE LAVAGEM: É essencial um procedimento de lavagem cuidadoso das tiras. Certifique-se de que cada um dos poços é completamente cheio até a cima e que a aspiração dos poços entre os ciclos de lavagem e após os mesmos é completa e que os poços são secos. Se houver líquido ainda nos poços, inverta a placa por cima de papel absorvente e dê ligeiras pancadas.
Lavador de placa automático: Siga as instruções do fabricante no que respeita a manutenção do aparelho e efectue os ciclos de lavagem requeridos antes e após cada etapa de incubação. O dispositivo de lavagem/aspiração não deve ser deixado com Solução de Lavagem no seu interior durante longos períodos, dado que, as agulhas podem ficar obstruídas, efectuando a distribuição e a sucção do líquido de forma deficiente.

D.. Cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio

- O protocolo do teste deve ser rigorosamente seguido. Respeite as indicações relativas ao tempo de incubação, à temperatura e aos procedimentos de lavagem. São fases fundamentais. Não deixe secar os poços entre as incubações. Consulte também a secção 9.0_PROCEDIMENTO DO ENSAIO.
- Inclua os controlos negativos e positivos em cada teste para monitorizar a estabilidade do reagente e o correcto desempenho do ensaio. Os valores de D.O. obtidos para os calibradores e os valores da concentração dos controlos devem ser sempre comparados com os valores indicados na ficha do Controlo de Qualidade. Consulte também as secções 10.1_VALIDADE DO ENSAIO e 10.2_CONTROLO DE QUALIDADE.
- Não utilize o kit para determinar valores que estejam fora do intervalo indicado nas Instruções de Utilização. Consulte também a secção 10.5_INTERVALO DE MEDIÇÕES.

8.0 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

O kit destina-se a ser usado com soro. Efectue a colheita do sangue por venipunctura e separe o soro de acordo com os procedimentos habituais. As amostras podem ser armazenadas a 2-8°C durante 24 horas. Para períodos mais longos conserve as amostras a -70°C ou abaixo. As amostras não devem ser conservadas num congelador auto-descongelável e não devem ser descongeladas e congeladas novamente antes da análise. Ponha as amostras congeladas a descongelar lentamente, de preferência a 2-8°C durante a noite e, em seguida, coloque-as à temperatura ambiente antes da análise.

9.0 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

9.1 PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Deixar que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (20...25°C). O ensaio só deve ser realizado com temperaturas entre 20-25°C para obter resultados exactos.
- Prepare a solução de trabalho de tampão de lavagem de acordo com o parágrafo 4.9;
- Prepare a solução de trabalho de conjugado de acordo com o parágrafo 4.2;
- Selecione um número suficiente de micropoços para o teste. Transfira a quantidade necessária de tiras de placas de microtítulos para um suporte de tiras. Coloque imediatamente as restantes tiras dentro da embalagem de alumínio que contém dessecante e sele-a com cuidado).
- Antes de iniciar a pipetagem dos calibradores e das amostras do doente é aconselhável marcar as tiras para poder identificar mais claramente as amostras durante e após o ensaio.
- Efectue cada determinação em duplicado quer para os calibradores quer para as amostras do doente. Deve ser realizada uma curva de calibração com cada um dos ensaios.

9.2 PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

- A. **Lave** todas as tiras uma vez com solução de trabalho de Tampão de Lavagem. Não lave mais tiras do que as que podem ser manuseadas nos 30 minutos seguintes.

- B. **Pipete**, em duplicado, 25 µL dos calibradores (CAL 0, 1, 2, 3, 4, 5), Controlos (C 1, C 2) e amostras do doente para dentro dos poços das tiras;
- C. **Adicione** 100 µL de Biotina Anti-CA19-9 a cada poço usando uma pipeta de precisão de 100 µL (ou uma pipeta de precisão de 100 µL de 8 canais). Evite fenómenos de "carry-over" segurando a ponta da pipeta ligeiramente acima do topo do poço e evite tocar na tira de plástico ou na superfície do líquido.
- D. **Incube** a placa durante 2 hora (± 5 minutos) à temperatura ambiente (20-25°C), mantendo a placa em vibração constante usando um agitador de placas de microtítulos.
- E. Após a primeira incubação **aspire** e **lave** cada uma das tiras 3 vezes, usando o mesmo procedimento descrito na secção 7.2C
- F. **Adicione** 100µl de solução de trabalho de conjugado a cada poço. Use o mesmo procedimento de pipetagem que no item E acima.
- G. **Incube** o suporte durante 1 hora (± 5 minutos) à temperatura ambiente (20-25°C) com vibração constante.
- H. Após a segunda incubação **aspire** e **lave** cada uma das tiras 6 vezes, usando o mesmo procedimento descrito na secção 7.2C.
- I. **Adicione** 100 µL de Substrato TMB HRP a cada poço usando a mesma técnica de pipetagem que utilizou no item 4. O substrato TMB HRP deve ser adicionado aos poços o mais rapidamente possível e o tempo decorrido entre a adição ao primeiro e ao último poço não deve exceder 5 minutos.
- J. **Incube** durante 30 minutos (± 5 minutos) à temperatura ambiente com vibração constante. Evite a exposição à luz solar directa.
- K. **Leia** imediatamente a D.O. a 620 nm num espectofotómetro de placas de microtítulos.

Opção Se o laboratório não tiver acesso a um leitor de placas de microtítulos capaz de efectuar a leitura a 620 nm, a D.O. pode ser determinada da seguinte forma: **Adicione** 100 µL de solução de lavagem, misture e leia a D.O. a 405 nm num espectofotómetro de placas de microtítulo no espaço de 15 minutos após a adição da Solução de Paragem.

10.0 CÁLCULO DE RESULTADOS

10.1 VALIDADE DO ENSAIO

Os controlos 1 e 2 podem ser usados para a validação das séries de ensaios. Os intervalos de valores esperados são indicados nos rótulos dos frascos. Se forem obtidos valores que estejam fora do intervalo especificado, deve ser efectuada uma verificação completa dos reagentes e do desempenho do leitor e a análise deve ser repetida.

10.2 CONTROLO DE QUALIDADE

Cada um dos laboratórios pode preparar, paralelamente, os seus próprios aglomerados de soro com níveis diferentes, que podem ser usados como controlos internos, de modo a assegurar a precisão do ensaio. Se os resultados estiverem fora do limite esperado, repita o ensaio, utilizando controlos preparados de fresco. Se os resultados continuarem a situar-se fora do limite específico, e após uma verificação do equipamento, do cumprimento do protocolo e dos procedimentos laboratoriais, contacte o fornecedor para obter assistência. Não relate os resultados dos pacientes se os resultados dos controlos estiverem fora dos limites aceitáveis.

10.3 REDUÇÃO DE DADOS: MÉTODO AUTOMÁTICO

Se for utilizado um espectofotómetro de placas de microtítulos com um programa de cálculo de dados próprio, consulte o manual do espectofotómetro e crie um programa usando a concentração indicada nos rótulos de cada um dos calibradores do CA19-9.

Para o cálculo automático dos resultados do CA19-9, recomenda-se qualquer um dos seguintes métodos:

- Método de curva *Cubic spline*. O calibrador 0 deve ser incluído na curva com o valor 0 U/mL.
- Método curva *Spline smoothed*. O calibrador 0 deve ser usado com placa do branco.
- Interpolação com avaliação *ponto a ponto*. O calibrador 0 deve ser incluído na curva com o valor 0 U/mL.
- Método *quadratic curve*. O calibrador 0 deve ser incluído na curva com o valor 0 U/mL.

NOTA: A regressão linear ou o método *4-parametric* não devem ser utilizados.

10.4 REDUÇÃO DE DADOS: MÉTODO MANUAL

É construída uma curva de calibração desenhando os valores da adsorção (D.O.) obtidos para cada calibrador, contra a correspondente concentração do CA19-9 (em µg/L); ver figura abaixo. As concentrações desconhecidas do

CA19-9 podem, então, ser lidas a partir da curva de calibração usando o valor médio da D.O. de cada amostra de doente.

10.5 INTERVALO DE MEDIÇÃO

O kit EIAgen Gi MARKER CA19-9 mede concentrações que se encontrem entre 1 e 240 U/mL. Se for de esperar concentrações do CA19-9 acima do intervalo de medição, recomenda-se a diluição das amostras com o calibrador 0 antes da análise.

Se as amostras, numa análise inicial, obtiverem níveis de CA19-9 superiores a 240 U/mL, estas devem ser diluídas na proporção de 1/10 e 1/100 com o calibrador 0 do CA19-9, para se obter a concentração exacta de CA19-9 nas amostras.

diluição 1/10 = 50 µL de amostra + 450 µL de Calibrador 0 do CA19-9
 diluição 1/100 = 50 µL de diluição 1:10 + 450 µL de Calibrador 0 do CA19-9

A concentração de CA19-9 da amostra não diluída é calculada como:

Diluição 1/10 = 10 x valor medido
Diluição 1/100 = 100 x valor medido

11.0 VALORES ESPERADOS

O CA19-9 foi medido em 100 doentes de sangue saudáveis, 36 mulheres e 64 homens. O valor médio obtido foi de 6,5 U/mL com um desvio padrão de 6,4. O valor médio foi de 4,5 U/mL, intervalo 0-29 U/mL. Os extremos inferiores e superiores do intervalo normal foram examinados usando tratamento estatístico não paramétrico recomendado pelo IFCC. O intervalo de referência contém a fracção central de 95% da distribuição de referência. Os limites de referência podem ser estimados como fractis de 2,5% (inferior) e 97,5% (superior). Estes limites cortam uma fracção de 2,5% dos valores em cada extremidade da distribuição de referência. Estimativas não paramétricas: N=100

Fracção	Limite de referência (U/mL)
2.5% (inferior)	0
97.5% (superior)	25

100% dos indivíduos saudáveis obtiveram valores no ensaio abaixo de 37 U/mL. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo normal, tendo em consideração factores ambientais locais como a dieta, o clima, as condições de vida, a selecção do doente, etc.

12.0 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O nível de CA19-9 não deve ser usada como evidência absoluta da presença ou ausência de doenças malignas e o teste CA19-9 não deve ser usado nos exames diagnósticos do cancro. Os resultados deste teste devem ser interpretados apenas em conjunto com outras análises e procedimentos efectuados para o diagnóstico da doença e tratamento dos doentes e o teste CA19-9 não deve substituir nenhum exame clínico convencional.

As patologias benignas tais como pancreatite aguda ou crónica ou colestíase, podem causar níveis elevados de CA19-9.

Os doentes com um fenótipo Le a-/b- não expressam o epítipo reactivo do CA19-9. Os anticorpos anti-reagentes (anticorpo anti-rato humano (HAMA) ou anticorpos heterofílicos) presentes na amostra do doente podem interferir, ocasionalmente, com o ensaio, embora os tampões contenham agentes bloqueadores específicos.

13.0 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

13.1 PRECISÃO

A precisão total foi determinada de acordo com a norma EP5-A (4) da NCCLS, usando quatro níveis de aglomerado de soro humano congelado, contendo um aglomerado de ascites. Cada uma das amostras foi pipetada aleatoriamente (n=2/análise) e analisada duas vezes por dia durante 20 dias. As análises foram efectuadas durante um período de 53 meses, por > de três técnicos diferentes e usando 20 lotes diferentes.

Amostra	Réplicas	Média U/mL	Intra-ensaio DP (U/mL)	Intra-ensaio CV %	Entre dias DP (U/mL)	Entre dias CV %
CA19-9 1	80	15.4	0.6	3.8	1.0	6.8
CA19-9 2	80	56.3	1.9	3.3	3.6	6.3
CA19-9 3	80	99.8	4.5	4.5	6.2	6.2
CA19-9 4	80	182	7.9	4.4	12	7.0

13.2 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção do ensaio CA19-9 EIA da ADALDIS é < 1 U/mL, definido como a concentração correspondente à média dos valores da D.O. do calibrador 0 mais dois desvios padrão, de acordo com a fórmula:

$$(2 \times DP \text{ CAL } 0) / (D.O. \text{ CAL } 1 - D.O. \text{ CAL } 0) \times 15U/ml$$

13.3 RECUPERAÇÃO

As amostras de soro fortalecidas foram preparadas adicionando níveis diferentes de antigénio CA19-9 humano a amostras de soro normal. A recuperação do antigénio estava dentro do intervalo 90-110%.

13.4 EFEITO DE GANCHO

Não se observou qualquer efeito de gancho com amostras até 50 000 U/mL.

NOTA: Em amostras com concentrações muito elevadas a cor do substrato passará de azul para esverdeado (e, eventualmente, amarelo no caso de amostras extremamente elevadas). Tal levará a uma D.O. falsamente baixa a 620 nm, e em casos extremos a D.O. pode encontrar-se dentro do intervalo da curva de calibração e ser vista como um gancho.

13.5 LINEARIDADE

Oito amostras de doentes foram diluídas em série com calibrador 0 e, posteriormente, analisadas. Os valores obtidos variavam entre 96% e 105% dos valores esperados, no intervalo de 10–200 U/mL.

13.6 ESPECIFICIDADE

O anticorpo monoclonal usado (C192) é altamente específico para o epítipo sialyl Lewis^a (1). Foi seguida a norma EP7-P (5) da NCCLS para determinar as possíveis fontes de interferência. Testaram-se as seguintes substâncias e concentrações, tendo-se verificado que estas não interferiam com o teste.

	Concentração sem interferência significativa (± 10%)
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirrubina, não conjugada	0,6 mg/ml
Hemoglobina	5 mg/ml

14.0 AUTOMATIZAÇÃO

A Adaltis está disponível para fornecer, mediante pedido, os protocolos de aplicação relativos à automatização adequada nos analisadores de tiras de microtítulos Adaltis.

15.0 SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

ERRO	POSSÍVEIS CAUSAS / SUGESTÕES
DO muito diferente (± 50%) da DO indicada no CQ	<ul style="list-style-type: none"> - dispensação incorrecta do volume de reagentes (sugestão: verifique a correspondência entre o volume dispensado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibre novamente as pipetas) - temperatura incorrecta ou tempo de incubação incorrecto (sugestão: mais cuidado com a manutenção da incubadora; anote o horário de início da incubação) - erro na lavagem ou na leitura do espectrofotómetro (sugestão: verificar o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos) - contaminação do Substrato (sugestão: utilize apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos)
Baixos resultados reprodutíveis	<ul style="list-style-type: none"> - dispensação irregular do volume das amostras ou reagentes (sugestão: verifique a precisão das pipetas e a correspondência entre o volume dispensado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibre novamente as pipetas) - erro na lavagem ou na leitura (sugestão: verificar o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos) - contaminação do Substrato (sugestão: utilize apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos) - poluição ou degradação dos reagentes (sugestão: utilize pontas adequadas, recipientes de plástico descartáveis e limpos para os reagentes e água destilada ou água equivalente de alta qualidade)
Nenhuma reacção colorimétrica após a adição do substrato	<ul style="list-style-type: none"> - algum reagente não foi pipetado; forte contaminação do conjugado ou do Substrato - erros na execução do procedimento do ensaio (ex.: pipetagem accidental dos reagentes numa sequência incorrecta ou a partir do frasco errado, etc.)
Reacção demasiado baixa (D.O.s demasiado baixas)	<ul style="list-style-type: none"> - diluição incorrecta do conjugado - tempo de incubação demasiado curto, temperatura da incubação demasiado baixa

Reacção demasiado alta (D.O.s demasiado altas)	<ul style="list-style-type: none"> - diluição incorrecta do conjugado - tempo de incubação demasiado longo, temperatura de incubação demasiado alta - baixa qualidade da água para o tampão de lavagem (baixo grau de desionização) - lavagem insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)
aspectos inexplicáveis	<ul style="list-style-type: none"> - contaminação das pipetas, pontas ou recipientes - lavagem irregular e insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)
CV% intra-ensaio demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> - os reagentes e/ou tiras não alcançaram a temperatura ambiente antes da utilização - O sistema de lavagem da placa não está a lavar devidamente (sugestão: limpar a cabeça do sistema de lavagem)
CV% entre ensaios demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> - condições de incubação não constantes (tempo, temperatura) - controlos e amostras não dispensados ao mesmo tempo (com os mesmos intervalos) (verificar a ordem da pipetagem) - variação relacionada com as pessoas intervenientes

16.0 BIBLIOGRAFIA

1. Rye P. D. et al., (1998) Summary report on the ISOBM TD-6 workshop: Analysis of 20 monoclonal antibodies against Sialyl Lewis_x and related antigens. Montreaux, Switzerland; September 19-24 1997. *Tumor Biol.* 19: 390-420.
2. Eskelinen M., and Haglund U. (1999) Developments in serologic detection of human pancreatic adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 34: 833-844.
3. Hammarström S., and Stigbrand T. (2002) Gastric Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACC Press, Washington pp 375-379.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999)
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)