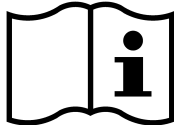


Product information

Information about other products is available on the internet: www.demeditec.com



User's Manual

TPA IRMA

*Radioimmunoassay for the quantitative determination of
cytokeratin 8 and 18 in serum*



DE3437



100

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

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

1	INTENDED USE	4
2	PRINCIPLE OF THE ASSAY	4
3	ASSAY SPECIFICITY	4
4	SPECIMENS	4
5	PRECAUTIONS FOR USERS	4
6	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7	COMPONENTS IN THE TPACYK IRMA	5
8	ASSAY PROCEDURE	6
9	PROCESSING OF RESULTS	6
10	REAGENT STORAGE	6
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	6
12	ASSAY CHARACTERISTICS	7
13	WARRANTY	7
14	REFERENCES / LITERATURE	7
1	ANWENDUNGSBEREICH	8
2	TESTPRINZIP	8
3	TESTSPEZIFITÄT	8
4	PROBEN	8
5	VORSICHTSMASSNAHMEN	8
6	BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT IM LIEFERUMFANG)	9
7	KOMPONENTEN IM TPACYK IRMA	9
8	TESTDURCHFÜHRUNG	10
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	10
10	LAGERUNG DER REAGENZIEN	10
11	GRENZEN DES VERFAHRENS	11
12	TESTCHARAKTERISTIK	11
13	GARANTIE	11
14	REFERENZEN / LITERATUR	11

1	USO	12
2	PRINCIPIO DEL DOSAGGIO	12
3	SPECIFICITA' DEL DOSAGGIO	12
4	CAMPIONI	12
5	PRECAUZIONI PER GLI UTILIZZATORI.....	12
6	MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI	13
7	COMPONENTI DEL TEST TPACYK IRMA.....	13
8	PROCEDURA DEL DOSAGGIO	14
9	RISULTATI.....	14
10	CONSERVAZIONE DEI REAGENTI	14
11	LIMITI DELLA PROCEDURA	15
12	CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO.....	15
13	GARANZIA.....	15
14	BIBLIOGRAFIA	15
1	USO PREVISTO	16
2	PRINCIPIO DEL ENSAYO.....	16
3	ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO	16
4	TIPO DE MUESTRA	16
5	PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS	16
6	MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS	17
7	COMPONENTES DE TPACYK IRMA	17
8	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	18
9	PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS.....	18
10	ALMACENAJE DE REACTIVOS	18
11	LIMITACIONES DEL ENSAYO.....	19
12	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	19
13	GARANTÍA.....	19
14	REFERENCIAS.....	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1 INTENDED USE

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

2 PRINCIPLE OF THE ASSAY

TPAcyk IRMA is a solid phase radiometric sandwich assay based on immunochemical technique. Standards, controls and samples react simultaneously with solid phase catcher antibodies (6D7 and 3F3) and the ¹²⁵I-labeled detector antibody during incubation in assigned tubes. After washing, the radioactivity is assessed in a gamma counter. The radioactivity is directly proportional to the concentration of the analyte.

3 ASSAY SPECIFICITY

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

4 SPECIMENS

Serum samples are recommended.

Enough blood should be collected to be sufficient for 2 x 100 µl serum (duplicates) at each analysis.

If the analysis will be performed within 24 h, the serum should be refrigerated (2-8 °C). If delayed analysis, serum should be frozen in aliquots (<-18 °C).

Avoid repeated thawing and freezing. Do not use serum samples that are grossly lipemic, hemolysed or contaminated.

5 PRECAUTIONS FOR USERS

5.1 General

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

5.2 Radioactive material

1. Radioactive material must be handled according to local regulations and may be received, acquired, possessed and used only by possessors of appropriate permissions.
2. Radioactive material should be stored and handled in designated areas. Immediately decontaminate spilled material. Wash all contaminated areas with a suitable detergent.
3. Do not eat, drink or smoke within the designated work area.
4. Wear protective gloves and goggles during handling of radioactive materials, wash hands thoroughly afterwards.
5. All material used should be considered as radioactive and disposed of in designated containers.

6 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Gamma counter for ^{125}I (efficiency > 40%).
Shaker for tubes (oscillation ~450 rpm).
Wash equipment for tubes.
Tubes and bead dispenser.
Routine laboratory equipment, e.g. precision pipettes and vortex.

7 COMPONENTS IN THE TPACYK IRMA

Materials supplied for 100 determinations.

TPAcyk Coated Beads:

1 bottle, 100 dry beads, coated with monoclonal anti-cytokeratin 8/18 antibodies (6D7 and 3F3).
Packed with desiccating device. Ready for use.

TPAcyk IRMA ^{125}I Tracer:

1 vial, 11 ml, ^{125}I -labeled antibody in protein stabilized buffer, pH 7.5. Radioactivity ~ 1.1 Mbq/vial. Red colored.
Preservative added. Ready for use.

TPAcyk Diluent (Standard 0 ng/ml):

1 vial, 15 ml, sample diluent and standard 0 ng/ml, protein stabilized buffer, pH 7.5. Preservative added.
Ready for use.

TPAcyk IRMA Standard (0.5, 1, 2, 5, 15, 30 ng/ml):

6 vials standard, 1 ml/vial, TPAcyk standard material in protein stabilized buffer, pH 7.5.
Concentrations as stated on vials. Preservative added.
Ready for use.

TPAcyk Control (Low, High):

2 vials control (1 ml/vial), lyophilized controls,
TPAcyk standard material in protein stabilized buffer, pH 7.5. Yellow colored. Preservative added.

Wash Tablet:

2 packages, 1 tablet/package.
Each tablet should be dissolved in 500 ml fresh deionized water.

TPAcyk IRMA Certificate:

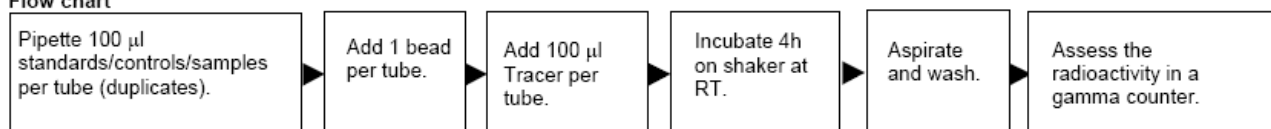
1 protocol. Certificate of lot content.

8 ASSAY PROCEDURE

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

1. Allow all reagents and samples to adjust to RT. Vortex all reagents prior to use.
2. Dilute the TPACyk Control (Low, High) with 1.0 ml fresh deionized water. Let vials stand, mix thoroughly after 10 min. Ready to use 15 min after reconstitution.
3. Pipette 100 μ l standards, controls or samples per tube (duplicates).
4. Add 1 bead per tube.
5. Add 100 μ l TPACyk IRMA ¹²⁵I Tracer to each tube. Cover the tubes with plastic film.
NB! Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption.
6. Incubate for 4 h \pm 5 min on shaker (~450 rpm).
7. Prepare the wash solution. Dissolve each Wash Tablet in 500 ml fresh deionized water.
8. Aspirate and wash the tubes 3 x 3 ml with wash solution.
9. Assess the radioactivity in a gamma counter. Add two empty tubes for background cpm measurement.
10. Calculate the cytokeratin 8 and 18 concentration (ng/ml) of the samples.
Samples showing concentrations >30 ng/ml value should be suitably diluted with TPACyk Diluent (Standard 0 ng/ml) before repeated analysis.

Flow chart



9 PROCESSING OF RESULTS

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

Manual processing of results:

Correct each cpm (counts per minute) value by subtracting the background radioactivity (cpm). Estimate the mean value for each duplicate. Construct a standard curve by plotting the mean cpm value for each standard (y-axis) against the corresponding concentration (x-axis). Determine the concentrations of the samples against the standard curve.

10 REAGENT STORAGE

The kit should be stored at 2-8 °C. **Do not freeze!**

Store reagents in their original containers if not used at once. Reseal the bottle with Coated Beads, including the desiccating device, if not all beads are used at once.

The wash solution is stable for 4 weeks when stored at 2-8 °C.

The reconstituted controls are stable for 4 weeks when stored at 2-8 °C.

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The test should not be used as a cancer screening test. The assay values should be interpreted in conjunction with all available clinical information. Increased values can also be found e.g. in cases of pregnancy, liver disease, renal failure and general infections. If a temporary infection is suspected, it may be necessary to repeat the test two weeks later.

12 ASSAY CHARACTERISTICS

Measuring range:

The measuring range is 0-30 ng/ml. The assay has no "high-dose hook effect" up to 500 ng/ml.

Reproducibility:

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

Sensitivity:

The minimal detectable concentration in TPACyk IRMA is 0.1 ng/ml, defined as the concentration of TPA that corresponds to the cpm being three standard deviations from the cpm of standard 0 ng/ml.

Expected values:

The 95th percentile for apparently healthy individuals (Swedish blood donors) has been determined to 1.0 ng/ml. Due to differences which may exist between laboratories and locales with respect to population, laboratory technique and selection of reference groups, it is recommended that each laboratory establishes its own normal range.

Recovery:

Specified quantities of TPACyk were added to human serum specimens. The recovery was 86-101 %.

13 WARRANTY

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

14 REFERENCES / LITERATURE

1. Stigbrand, T. et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Silén, Å. et al. A novel IRMA and ELISA for quantifying cytokeratin 8 and 18 fragments in the sera of healthy individuals and cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 153-161.
3. Correale, M. et al. TPACyk assay in cytosol from primary breast cancer: preliminary results. *Int J Biol Markers* 1994; 9: 264-265.

1 ANWENDUNGSBEREICH

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

2 TESTPRINZIP

TPAcyk IRMA ist ein auf der Sandwichtechnik basierender, festphasengebundener immunradiometrischer Assay. Standards, Kontrollen und Proben reagieren während der Inkubation gleichzeitig mit festphasengebundenen Fängerantikörpern (6D7 und 3F3) und dem ¹²⁵I-markierten Detektorantikörper in gekennzeichneten Röhrchen. Nach dem Waschen wird die Radioaktivität in einem Gamma Counter gemessen. Die Radioaktivität verhält sich direkt proportional zur Analytkonzentration.

3 TESTSPEZIFITÄT

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

4 PROBEN

Serumproben werden empfohlen.

Eine ausreichende Menge Blut sollte entnommen werden, um mindestens 2 x 100 µl Serum (Doppelbestimmung) für jede Messung zu erhalten.

Wenn die Messung innerhalb von 24 Stunden erfolgt, sollten die Proben gekühlt (2-8 °C) gelagert werden. Für spätere Messungen sollte das Serum portioniert tiefgefroren (<-18 °C) werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Stark lipämische, hämolytische oder kontaminierte Proben können nicht verwendet werden.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

5.1 Allgemeines

1. TPAcyk IRMA ist ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik einzusetzen.
2. Schutzhandschuhe und Schutzbrille tragen.
3. Der Kit darf nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
4. Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen nicht gemischt werden.
5. Alle Patientenproben sollten als potentiell infektiös angesehen werden und entsprechend der geltenden Richtlinien gehandhabt und entsorgt werden.
6. Mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien sind zu vermeiden.
7. Die Messungen sollten gemäß GLP durchgeführt werden.
8. Die Richtigkeit des Test hängt von der exakten Testdurchführung und dem akkuraten Pipettieren der Volumina ab.
9. ProClin 300 (60 ppm), das dem Produkt als Konservierungsstoff zugesetzt ist, kann Allergien auslösen. Bei Kontakt mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt konsultieren.
10. SICHERHEITSDATENBLÄTTER sind auf Anfrage erhältlich.

5.2 Radioaktives Material

1. Beim Umgang mit radioaktivem Material sind die örtlichen Bestimmungen zu beachten. Nur Personen mit einer entsprechenden Erlaubnis dürfen solches Material in Empfang nehmen, käuflich erwerben, besitzen und in Gebrauch nehmen.
2. Radioaktives Material darf nur in gekennzeichneten Zonen aufbewahrt und in Gebrauch genommen werden. Verschüttetes Material muss sofort dekontaminiert werden. Reinigen Sie sämtliche kontaminierten Flächen mit einem geeigneten Reinigungsmittel.

3. In dem gekennzeichneten Arbeitsbereich darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
4. Tragen Sie beim Umgang mit radioaktivem Material Schutzhandschuhe und -brille. Waschen Sie Ihre Hände anschließend gründlich.
5. Sämtliches benutzte Material ist als radioaktiv zu betrachten und muss in gekennzeichneten Containern entsorgt werden.

6 BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT IM LIEFERUMFANG)

Gamma Counter für I-125 (Wirkungsgrad > 40%).

Shaker für Röhrchen (Oszillation ~450 rpm).

Waschausrüstung für Röhrchen.

Röhrchen und Kugelspender.

Routine-Laboraausstattung, z.B. Präzisionspipetten und Vortexer.

7 KOMPONENTEN IM TPACYK IRMA

Material ausreichend für 100 Bestimmungen.

TPAcyk Coated Beads:

1 Flasche, 100 trockene Kugeln, mit monoklonalen Anti-Cytokeratinantikörpern 8/18 beschichtet (6D7 und 3F3). Mit Trockenmittel abgepackt. Gebrauchsfertig.

TPAcyk IRMA ¹²⁵I Tracer:

1 Fläschchen, 11 ml, ¹²⁵I-markierte Antikörper in proteinstabilisiertem Puffer, pH 7.5. Radioaktivität ~ 1.1 Mbq/Fläschchen. Rot eingefärbt. Enthält Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

TPAcyk Diluent (Standard 0 ng/ml):

1 Fläschchen, 15 ml, Verdünnungsreagenz und Standard 0 ng/ml, proteinstabilisierter Puffer, pH 7.5. Enthält Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

TPAcyk IRMA Standard (0.5, 1, 2, 5, 15, 30 ng/ml):

6 Fläschchen Standard, 1 ml/Fläschchen, TPAcyk Standardmaterial in proteinstabilisiertem Puffer, pH 7.5. Konzentrationen wie auf den Fläschchenetiketten angegeben. Enthält Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

TPAcyk Control (Low, High):

2 Fläschchen (1 ml/Fläschchen), lyophilisierte Kontrollen, TPAcyk Standardmaterial in proteinstabilisiertem Puffer pH 7.5. Gelb eingefärbt. Enthält Konservierungsmittel.

Wash Tablet:

2 Verpackungen, 1 Tablette/Verpackung.

Jede Tablette wird in 500 ml frischem entionisiertem Wasser aufgelöst.

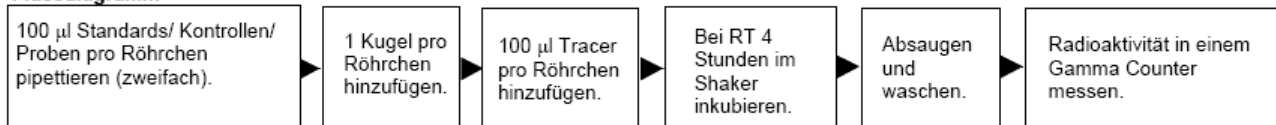
TPAcyk IRMA Certificate: 1 Protokoll. Zertifikat zum Inhalt der Charge.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Der Assay (*siehe* Flussdiagramm) sollte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. (RT; 22 ± 6 °C).

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch vortexen.
2. Die TPAcyk Control (Low, High) mit 1.0 ml frisch entionisiertem Wasser verdünnen. Die Fläschchen stehen lassen und nach 10 Minuten sorgfältig mischen. Gebrauchsfertig nach 15 Minuten Rekonstitution.
3. 100 µl Standards, Kontrollen oder Proben pro Röhrchen pipettieren (zweifach).
4. Pro Röhrchen eine Kugel hinzugeben.
5. Pro Röhrchen 100 µl TPAcyk IRMA ¹²⁵I Tracer hinzugeben. Röhrchen mit Plastikfolie abdecken.
Hinweis! Die Schritte 4 und 5 müssen nacheinander ohne Unterbrechung durchgeführt werden.
6. 4 Std. ± 5 Min. im Schüttler (~450 rpm) inkubieren.
7. Die Waschlösung vorbereiten. Jede Tablette in 500 ml frischem entionisiertem Wasser auflösen.
8. Absaugen und die Röhrchen 3 x 3 ml mit Waschlösung auswaschen.
9. Radioaktivität in einem Gamma Counter messen. Zwei leere Röhrchen für die cpm-Hintergrundmessung hinzufügen.
10. Berechnung der Cytokeratin 8 und 18 Konzentrationen (ng/ml) der Proben.
Proben mit Konzentrationen >30 ng/ml müssen vor der Wiederholungsmessung mit TPAcyk Diluent (Standard 0 ng/ml) verdünnt werden.

Flussdiagramm



9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Manuelle oder Computergestützte Berechnung mittels Programm für Daten vom IRMA-Typ (Kurvenanpassung – geglättete Spline-Funktion). Um die Validität der Ergebnisse zu gewährleisten ist sicherzustellen, dass die Kontrollen innerhalb der Zielbereiche gefunden werden.

Manuelle Bearbeitung der Ergebnisse:

Jeden cpm-Wert durch Abziehen der Hintergrundstrahlung (cpm) korrigieren. Berechnen Sie den Durchschnittswert für jedes Duplikat. Durch die Auftragung des durchschnittlichen cpm-Wertes für jeden Standard auf der y-Achse und der korrespondierenden Konzentration auf der x-Achse erhalten Sie die Standardkurve. Bestimmen Sie die Konzentrationen der Proben im Vergleich zur Standardkurve.

10 LAGERUNG DER REAGENZIEN

Der Kit sollte bei 2-8 °C gelagert werden. **Nicht einfrieren!**

Wenn die Reagenzien nicht auf einmal verbraucht werden, in den Originalgefäßen lagern. Flasche mit beschichteten Kugeln erneut versiegeln, einschl. Trockenmittel, wenn nicht alle Kugeln sofort verbraucht werden.

Die Waschlösung bleibt bei einer Lagertemperatur von 2-8° C vier Wochen stabil.

Die rekonstituierten Kontrollen bleiben bei einer Lagertemperatur von 2-8° C vier Wochen stabil.

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Der Test kann nicht zum Screening auf Krebserkrankungen eingesetzt werden. Die Ergebnisse sollten immer in Verbindung mit anderen verfügbaren klinischen Informationen bewertet werden. Erhöhte Werte finden sich auch z.B. bei Schwangerschaft, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen und allgemeinen Infektionen. Wenn eine temporäre Infektion vermutet wird, ist es notwendig, den Test nach zwei Wochen erneut durchzuführen.

12 TESTCHARAKTERISTIK

Messbereich:

Der Messbereich ist 0-30 ng/ml. Ein "High-Dose Hook Effekt" kann bis zu 500 ng/ml nicht beobachtet werden.

Präzision:

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

Sensitivität:

Die untere Nachweisgrenze der Konzentration in TPACyk IRMA beträgt 0.1 ng/ml. Sie wird als die Konzentration von TPA definiert, deren cpm-Wert der dreifachen Abweichung vom Nullstandard entspricht.

Zu erwartende Werte:

Die 95 Perzentile für offensichtlich gesunde Probanden (Schwedische Blutspender) wurde mit 1.0 ng/ml ermittelt. Auf Grund von Unterschieden zwischen Laboratorien, Regionen bezüglich der Population, Labortechniken und Auswahl der Referenzkollektive wird jedem Labor empfohlen, sich seine eigenen Referenzbereiche zu ermitteln.

Wiederfindung:

Bestimmte Mengen an TPACyk wurden humanen Serumproben hinzugefügt. Die Wiederfindung lag zwischen 86-101 %.

13 GARANTIE

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

14 REFERENZEN / LITERATUR

1. Stigbrand, T. et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Silén, Å. et al. A novel IRMA and ELISA for quantifying cytokeratin 8 and 18 fragments in the sera of healthy individuals and cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 153-161.
3. Correale, M. et al. TPACyk assay in cytosol from primary breast cancer: preliminary results. *Int J Biol Markers* 1994; 9: 264-265.

1 USO

TPAcyk IRMA è un dosaggio diagnostico *in vitro* ad uno step per la determinazione quantitativa della citocheratina 8 e 18 nel siero. Questo dosaggio è un indicatore sensibile dell'attività delle cellule tumorali, particolarmente utile nel trattamento dei pazienti affetti da carcinoma di origine epiteliale.

2 PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

TPAcyk IRMA è un dosaggio radiometrico "sandwich" in fase solida basato su una tecnica immunochimica. Gli standard, i controlli e i campioni reagiscono simultaneamente con gli anticorpi di cattura della fase solida (6D7 e 3F3) e con l'anticorpo di rilevamento marcato con ^{125}I durante l'incubazione nelle provette assegnate. Dopo il lavaggio, viene determinata la radioattività in un contatore gamma. La radioattività è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita.

3 SPECIFICITA' DEL DOSAGGIO

TPAcyk misura gli epitopi principali sui frammenti di TPA (antigene polipeptidico tissutale). Gli anticorpi monoclonali 6D7 e 3F3 utilizzati nel test sono specifici per la citocheratina 8 e 18, senza crossreattività rilevabile verso altri antigeni associati ai tumori che possano essere presenti nei campioni dei pazienti.

4 CAMPIONI

Si consiglia l'utilizzo di campioni di siero.

Per ogni dosaggio in duplicato sono necessari almeno 2 x 100 µl di siero.

Il campione è stabile fino a 24 ore a 2-8 °C e, suddiviso in aliquote a < -18 °C o a temperature inferiori per periodi più lunghi.

Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Non utilizzare campioni di siero fortemente lipemici, emolizzati o contaminati.

5 PRECAUZIONI PER GLI UTILIZZATORI

5.1 Generale

1. Il kit TPAcyk IRMA è solo ad uso diagnostico *in vitro*.
2. Usare guanti e occhiali protettivi.
3. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
4. Non mescolare reagenti di lotti diversi.
5. Tutti i campioni devono essere considerati infettivi e conseguentemente manipolati ed eliminati secondo le normative di legge vigenti.
6. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti.
7. Le analisi devono essere eseguite secondo i criteri di BPL.
8. L'accuratezza del test è correlata ad una attenta adesione alle procedure del dosaggio ed all'accuratezza dei sistemi di dispensazione, lavaggio e conteggio.
9. Usato come conservante in questo prodotto, il ProClin 300 (60 ppm) può provocare allergie. In caso di contatto lavare la parte con abbondante acqua e contattare un medico.
10. Su richiesta sono disponibili opuscoli illustrativi sulla sicurezza dei materiali.

5.2 Materiale radioattivo

1. Il materiale radioattivo deve essere manipolato in base ai regolamenti locali e può essere ricevuto, acquistato, posseduto e utilizzato esclusivamente da chi ha ottenuto i permessi appropriati.
2. Conservare e manipolare il materiale radioattivo in zone designate. Decontaminare immediatamente l'eventuale materiale versato. Lavare tutte le aree contaminate con un detergente idoneo.
3. Non mangiare, bere o fumare all'interno dell'area di lavoro designata.
4. Indossare guanti e occhiali protettivi durante la manipolazione di materiali radioattivi e lavare le mani per bene subito dopo.
5. Considerare come radioattivi tutti i materiali utilizzati e smaltirli in contenitori specifici.

6 MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Contatore gamma per ^{125}I (efficienza > 40%).
Agitatore per provette (oscillazione ~450 rpm).
Attrezzatura di lavaggio per provette.
Provette e dispenser per sferette.
Attrezzatura di laboratorio, pipette di precisione e vortex.

7 COMPONENTI DEL TEST TPACYK IRMA

Materiali forniti per 100 determinazioni.

TPAcyk Coated Beads:

1 flacone, 100 sferette disidratate, coattate con anticorpi monoclonali anti-citocheratina 8/18 (6D7 e 3F3).
Confezionate con essiccante. Pronte all'uso.

TPAcyk IRMA ^{125}I Tracer:

1 flacone, 11 ml, anticorpo marcati ^{125}I in una soluzione/tampone proteica stabilizzata, pH 7.5. Radioattività ~ 1.1 Mbq/flacone. Colorato in rosso. Conservanti aggiunti. Pronto all'uso.

TPAcyk Diluent (Standard 0 ng/ml):

1 flacone, 15 ml, diluente del campione e standard 0 ng/ml, in un tampone proteico stabilizzato, pH 7,5.
Conservante aggiunto. Pronto all'uso.

TPAcyk IRMA Standard (0,5, 1, 2, 5, 15, 30 ng/ml):

6 flaconi standard, 1 ml/flacone, TPAcyk materiale standard in tampone proteico stabilizzato, pH 7.5.
Concentrazioni come indicato sui flaconi.
Conservante aggiunto. Pronti all'uso.

TPAcyk Control (Low, High):

2 flaconi di controllo (1 ml/flacone), Controlli liofilizzati,
TPAcyk materiale standard in un tampone proteico stabilizzato, pH 7.5. Colore giallo. Conservante aggiunto.

Wash Tablet:

2 confezioni, 1 compressa/confezione.
Sciogliere ogni compressa in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

TPAcyk IRMA Certificate:

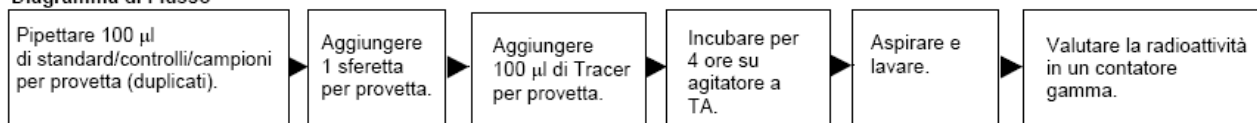
1 protocollo. Certificato del contenuto.

8 PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Il dosaggio (*vedi diagramma di flusso*) deve essere eseguito a temperatura ambiente (TA; 22 ± 6 °C).

1. Portare reagenti e campioni a temperatura ambiente. Agitare su vortex reagenti e campioni prima dell'uso.
2. Diluire il TPACYK Control (Low, High) con 1.0 ml acqua deionizzata fresca. Lasciare riposare i flaconi e dopo 10 minuti mescolare accuratamente. Pronto per l'uso 15 minuti dopo la ricostituzione.
3. Pipettare 100 µl di standard, controlli o campioni per provetta (duplicati).
4. Aggiungere 1 sferetta per provetta.
5. Aggiungere 100 µl di TPACYK IRMA ¹²⁵I Tracer in ogni provetta. Ricoprire le provette con una pellicola in plastica.
NB! Effettuare le fasi 4 e 5 in maniera sequenziale senza interruzioni.
6. Incubare per 4 h \pm 5 min su agitatore rotante (~450 rpm).
7. Preparare la soluzione di lavaggio. Sciogliere ogni Compresa per lavaggio in 500 ml di acqua fresca deionizzata.
8. Aspirare e lavare le provette 3 x 3 ml con la soluzione di lavaggio.
9. Valutare la radioattività in un contatore gamma. Aggiungere due provette vuote per la misurazione cpm di background
10. Calcolare la concentrazione di citocheratina 8 e 18 (ng/ml) dei campioni.
Campioni con concentrazioni >30 ng/ml devono essere opportunamente diluiti con il TPACYK Diluent (Standard 0 ng/ml) e ridosati.

Diagramma di Flusso



9 RISULTATI

Calcolare i dati manualmente o con un sistema computerizzato di elaborazione dei dati di tipo IRMA (curve fitting–Spline smoothed). Perchè i dati ottenuti possano essere considerati validi è necessario che i valori dei controlli siano compresi nell'intervallo indicato.

Elaborazione manuale dei risultati:

Correggere ogni valore cpm (conteggio per minuto) sottraendo la radioattività di background (cpm). Stimare il valore medio desiderato per ogni duplicato. Costruire una curva standard tracciando su un diagramma il valore cpm medio per ogni standard (asse y) rispetto alla concentrazione corrispondente (asse x). Determinare le concentrazioni dei campioni rispetto alla curva standard.

10 CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Il kit deve essere conservato a 2-8 °C. **Non Congelare!**

Conservare i reagenti avanzati nei loro contenitori originali. Risigillare il flacone con le sferette coattate, inserendo l'essiccante, se non sono ancora state utilizzate tutte le sferette.

La soluzione di lavaggio è stabile per 4 settimane se conservata a 2-8 °C.

I controlli ricostituiti sono stabili per 4 settimane se conservati a 2-8 °C.

11 LIMITI DELLA PROCEDURA

Il test non deve essere utilizzato come test di screening del cancro.

I valori del dosaggio devono essere interpretati unitamente alle altre informazioni cliniche. Valori aumentati possono essere anche riscontrati in gravidanza, nelle malattie epatiche, nelle patologie renali e nelle infezioni. In caso di malattia infettiva acuta, ripetere il dosaggio dopo due settimane.

12 CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Range di misura:

Il range di misura è 0-30 ng/ml. il dosaggio non presenta "effetto gancio" fino a 500 ng/ml.

Riproducibilità:

La riproducibilità intra-dosaggio della curva standard ha un CV tipico <5 % (nei duplicati). L'imprecisione inter-dosaggio ha un CV tipico 5-10 %.

Sensibilità:

La concentrazione minima rilevabile nel dosaggio TPAcyk IRMA è 0.1 ng/ml, definita come la concentrazione di TPA che corrisponde al cpm pari a tre deviazioni standard dal cpm di 0 ng/ml standard.

Valori Attesi:

Il 95° percentile per individui apparentemente sani (donatori di sangue Svedesi) è risultato essere 1.0 ng/ml. A causa delle differenze che possono esistere tra i laboratori in relazione alla popolazione, alla tecnica di laboratorio ed alla selezione dei gruppi di riferimento, si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire il proprio intervallo di normalità.

Recupero:

sono state aggiunte quantità note di TPAcyk a campioni di siero umano. Il recupero è stato del 86-101 %.

13 GARANZIA

Le prestazioni del dosaggio qui presentate sono state ottenute utilizzando la procedura indicata. Qualsiasi cambiamento o modifica della procedura, non indicato da DEMEDITEC, può modificare i risultati. In tal caso DEMEDITEC disconosce le garanzie espresse, implicite o esplicite, inclusa la garanzia che il prodotto sia commerciabile ed idoneo all'utilizzo.

14 BIBLIOGRAFIA

1. Stigbrand, T. et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. Tumor Biol 1998; 19:132-152.
2. Silén, Å. et al. A novel IRMA and ELISA for quantifying cytokeratin 8 and 18 fragments in the sera of healthy individuals and cancer patients. Scand J Clin Lab Invest 1995; 55: 153-161.
3. Correale, M. et al. TPAcyk assay in cytosol from primary breast cancer: preliminary results. Int J Biol Markers 1994; 9: 264-265.

1 USO PREVISTO

TPAcyk IRMA es un ensayo de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de citoqueratina 8 y 18 en suero. El ensayo es un indicador sensible de la actividad de célula tumoral, útil para el tratamiento de pacientes con carcinomas de origen epitelial.

2 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El TPAcyk IRMA es un ensayo tipo sandwich radiométrico de fase sólida basado en la técnica inmunoquímica. Los estándares, controles y muestras reaccionan simultáneamente con anticuerpos captadores de fase sólida (6D7 y 3F3) y con el anticuerpo detector marcado con ^{125}I durante la incubación en tubos asignados. Después del lavado, se determina la radioactividad en un contador gamma. La radioactividad es directamente proporcional a la concentración del analito.

3 ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO

TPAcyk mide los determinantes antigénicos clave de fragmentos TPA (Tissue Polypeptide Antigen). Los anticuerpos monoclonales 6D7 y 3F3 utilizados en la prueba son específicos para citoqueratina 8 y 18, sin reacción cruzada detectable con antígenos relacionados con otros tumores que pueda haber en muestras de pacientes.

4 TIPO DE MUESTRA

Se recomienda usar muestras de suero.

Debe recogerse sangre suficiente para 2 x 100 µl de suero (duplicados) en cada análisis.

Si el análisis ha de realizarse dentro de 24 horas, se debe refrigerar el suero (2-8 °C). Para análisis retardados, debe congelarse el suero en alícuotas (<-18 °C).

Evitar la descongelación y congelación repetidas. No utilizar muestras de suero que sean muy lipémicas, hemolizadas o contaminadas.

5 PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

5.1 Generalidades

1. TPAcyk IRMA está destinado para su uso en diagnóstico *in vitro* solamente.
2. Usar guantes protectores y gafas protectoras.
3. No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
4. No mezclar reactivos de lotes diferentes.
5. Todas las muestras de pacientes deben considerarse como contagiosas y manipularse y desecharse de acuerdo con la normativa vigente.
6. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos.
7. El análisis debe efectuarse según BPL.
8. La precisión de la prueba está relacionada con la adherencia al procedimiento de ensayo y con el pipetado de volumen preciso.
9. ProClin 300 (60 ppm), que se utiliza como conservante en el producto, puede ser alergénico. En caso de contacto, enjuagar con agua abundante y consultar a un médico.
10. Hay disponibles hojas de datos de seguridad de material que se entregan por solicitud.

5.2 Material radioactivo

1. El material radioactivo ha de manejarse según la normativa local y sólo puede ser recibido, adquirido, poseído y utilizado por los titulares de los permisos adecuados.
2. El material radioactivo ha de ser almacenado y manejado en las áreas designadas. Hay que descontaminar inmediatamente el material vertido. Lavar todas las áreas contaminadas con un detergente adecuado.
3. No comer, beber ni fumar dentro del área de trabajo designada.
4. Utilizar guantes y gafas protectoras durante el manejo de los materiales radioactivos; lavar después minuciosamente las manos.
5. Todo el material utilizado ha de ser considerado como radioactivo y ser eliminado en contenedores designados para ello.

6 MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

Contador gamma para ^{125}I (eficiencia > 40%).

Agitador para tubos (oscilación ~450 rpm).

Equipamiento de lavado para tubos.

Tubos y dispensador de cuentas.

Equipo de laboratorio común; por ejemplo, pipetas de precisión y centrifuga.

7 COMPONENTES DE TPACYK IRMA

Materiales suministrados para 100 determinaciones.

TPAcyk Coated Beads:

1 botella, 100 cuentas secas, recubiertas con anticuerpos anti-citoqueratina 8/18 monoclonales (6D7 y 3F3). Empaquetadas con dispositivo desecante. Listas para uso.

TPAcyk IRMA ^{125}I Tracer:

1 frasco, 11 ml, anticuerpo mercado con ^{125}I en solución tampón estabilizada con proteína, pH 7.5. Radioactividad ~ 1.1 Mbq/frasco. Color rojo. Conservante añadido. Listo para uso.

TPAcyk Diluent (Standard 0 ng/ml):

1 frasco, 15 ml, disolvente de muestra y estándar 0 ng/ml, solución tampón estabilizada con proteína, pH 7.5. Con conservante añadido. Listo para usar.

TPAcyk IRMA Standard (0.5, 1, 2, 5, 15, 30 ng/ml):

6 frascos de estándar, 1 ml/frasco, material estándar TPAcyk en solución tampón estabilizada con proteína, pH 7.5.

Concentraciones según se indica en los frascos.

Con conservante añadido. Listos para usar.

TPAcyk Control (Low, High):

2 frascos de control (1 ml/frasco), controles liofilizados, material estándar TPAcyk en solución tampón estabilizada con proteína, pH 7.5. Color amarillo. Con conservante añadido.

Wash Tablet:

2 paquetes, 1 tableta/paquete.

Cada tableta ha de disolverse en 500 ml de agua dulce desionizada.

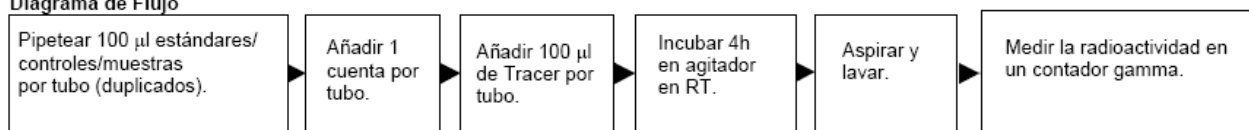
TPAcyk IRMA Certificate: 1 protocolo. Certificado de contenido de lote.

8 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

El ensayo (ver el diagrama de Flujo) debe efectuarse a temperatura ambiente (RT; 22 ± 6 °C).

1. Todos los reactivos y muestras deben ser conformes a RT. Centrifugar todos los reactivos antes de usarlos.
2. Diluir el TPAcyk Control (Low, High) con 1.0 ml de agua dulce desionizada. Dejar reposar los frascos y mezclar bien después de 10 minutos. Preparado para usar después de 15 minutos de reconstitución.
3. Pipetear 100 µl estándares, controles o muestras por tubo (duplicados).
4. Añadir una cuenta por tubo.
5. Añadir 100 µl TPAcyk IRMA ¹²⁵I Tracer a cada tubo. Cubrir los tubos con película de plástico. *Nota: Los puntos 4 y 5 han de ejecutarse secuencialmente, sin interrupción.*
6. Incubar durante 4 horas \pm 5 minutos en un agitador (~450 rpm).
7. Preparar la solución de lavado. Disolver cada tableta de lavado en 500 ml de agua dulce desionizada.
8. Aspirar y lavar los tubos 3 x 3 ml con la solución de lavado.
9. Medir la radioactividad en un contador gamma. Añadir dos tubos vacíos para la medición cpm de fondo.
10. Calcular la concentración de citoqueratina 8 y 18 (ng/ml) de las muestras.
Las muestras que presenten un valor de concentración >30 ng/ml deben diluirse adecuadamente con TPAcyk Diluent (Standard 0 ng/ml) antes de repetir el análisis.

Diagrama de Flujo



9 PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Cálculo manual o con software de ordenador para tratamiento de datos tipo IRMA (ajuste de curvas – alisado). Para la regeneración de datos válidos, comprobar que los controles incluidos están dentro del rango.

Procesamiento manual de resultados:

Corregir cada cpm (cuentas por minuto) sustrayendo la radioactividad de fondo (cpm). Estimar el valor medio de cada duplicado. Construir una curva estándar dibujando el valor cpm medio para cada estándar (eje y) con la concentración correspondiente (eje x). Determinar las concentraciones de las muestras sobre la curva estándar.

10 ALMACENAJE DE REACTIVOS

El kit debe almacenarse a 2-8 °C. **¡No congelar!**

Almacenar los reactivos en sus envases originales si no se van a usar de inmediato. Si no se van a utilizar inmediatamente todas las cuentas, resellar la botella con las cuentas recubiertas, incluyendo el dispositivo desecante.

La solución de lavado es estable durante cuatro semanas si se almacena a una temperatura de 2-8 °C.

Los controles reconstituidos son estables durante cuatro semanas si se almacenan a temperaturas de 2-8 °C.

11 LIMITACIONES DEL ENSAYO

La prueba no se debe utilizar para el diagnóstico sistemático de cáncer. Los valores de ensayo deben interpretarse junto con toda la información clínica disponible. También pueden hallarse valores aumentados en, por ejemplo, casos de embarazo, enfermedad hepática, deficiencia renal e infecciones generales. Si se sospecha una infección temporal, puede ser necesario repetir la prueba dos semanas más tarde.

12 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Rango de medición:

El rango de medición es de 0-30 ng/ml. El ensayo no tiene "efecto de enganche por dosis alta" hasta 500 ng/ml.

Reproductibilidad:

La reproductibilidad entre ensayos de la curva estándar tiene un CV típico de <5 % (en duplicados).

La imprecisión entre ensayos característica es de 5-10 % CV.

Sensibilidad:

La concentración detectable mínima en TPACyk IRMA es de 0.1 ng/ml, definida como la concentración de TPA que corresponde a tres desviaciones estándar del cpm estándar de 0 ng/ml.

Valores esperados:

El percentil 95 para individuos aparentemente sanos (donantes de sangre suecos) se ha determinado en 1.0 ng/ml. Debido a las diferencias que pueden existir entre laboratorios y poblaciones locales, la técnica de laboratorio y la selección de grupos de referencia, se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango.

Recuperación:

Se añadieron cantidades especificadas de TPACyk a especímenes de suero humano. La recuperación fue del 86-101 %.



13 GARANTÍA

Los datos de funcionamiento presentados aquí se obtuvieron utilizando el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación del procedimiento, que no sea recomendado por DEMEDITEC, puede influir en los resultados. En tal caso, DEMEDITEC rechaza todas las garantías expresadas, implícitas o reglamentarias, incluso la garantía de comercialización implícita y la aptitud de empleo.

14 REFERENCIAS

1. Stigbrand, T. et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998; 19:132-152.
2. Silén, Å. et al. A novel IRMA and ELISA for quantifying cytokeratin 8 and 18 fragments in the sera of healthy individuals and cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 153-161.
3. Correale, M. et al. TPACyk assay in cytosol from primary breast cancer: preliminary results. *Int J Biol Markers* 1994; 9: 264-265.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità