

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

CONTENTS

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	9
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СА72-4 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «СА72-4-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СА72-4-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации СА72-4 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. СА72-4, или углеводный антиген 72-4 с высокой молекулярной массой (м.м. 230 – 1000 кДа), представляет собой антиген (эпитоп), ассоциированный с раком желудка, карциномой яичников и некоторыми другими опухолями. Количественное определение СА72-4 в сыворотке или плазме крови, особенно одновременно с определением углеводного антигена сиалил-Льюиса СА19-9 (ХЕМА кат. № К223) используется в целях контроля течения и терапии рака желудка, а также вместе с СА125 (ХЕМА кат. № К222) – в целях мониторинга рака яичников. СА72-4 в норме практически не экспрессируется здоровыми тканями у взрослых. Увеличенная концентрация углеводного антигена 72-4 отмечается в высоком проценте случаев рака желудочно-кишечного тракта, яичников и легких. Кроме того, повышение уровня СА72-4 обнаруживается у небольшого числа пациентов с разнообразными доброкачественными заболеваниями. В связи с этим, данные по содержанию СА72-4 всегда следует интерпретировать в комплексе с результатами других методов исследования и клиническими данными.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение СА72-4 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к СА72-4 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание СА72-4, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к СА72-4 человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации СА72-4 в исследуемом образце. Концентрацию СА72-4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания СА72-4 в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование мышинных моноклональных антител к СА72-4 позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания СА72-4 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СА72-4-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации СА72-4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей СА72-4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5–200 Ед/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СА72-4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 15 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «СА72-4-ИФА» концентрация СА72-4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 2 Ед/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P244Z	SORB MTP	Пластишет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C244Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества СА72-4 - 0 ; 5 ; 15 ; 50 ; 200 Ед/мл, готовы к использованию (по 0.5 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q244Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием СА72-4, готова к использованию (0.5 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
4 T244Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S014Z2	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (22 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K244I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «СА72-4-ИФА»	1	шт.	-
11 K244Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «СА72-4-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «СА72-4-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации СА72-4 в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация SA72-4 в исследуемом образце превышает 200 Ед/мл, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S014Z2). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки планшет по 100 мкл ИФА-Буфера.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 120 минут при температуре +37 °С .
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С .
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз .
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина . Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация SA72-4 в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание SA72-4 в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций СА72-4 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (2 Ед/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (200 Ед/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация СА72-4 ниже 2 Ед/мл или выше 200 Ед/мл.

Исследуемая группа	Единицы, Ед/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	6.0

11. ЛИТЕРАТУРА

1. DJ Byrne, MC Browning, and A Cuschieri – CA72-4: a new tumour marker for gastric cancer. Br J Surg, Sep 1990; 77(9): 1010-3.
2. Ian J. Jacobs and Usha Menon – Progress and Challenges in Screening for Early Detection of Ovarian Cancer. Mol. Cell. Proteomics, Apr 2004; 3: 355 – 366.
3. R Hamazoe, M Maeta, T Matsui, S Shibata, S Shiota, and N Kaibara – CA72-4 compared with carcinoembryonic antigen as a tumour marker for gastric cancer. Eur J Cancer, Jan 1992; 28A(8-9): 1351-4.

По вопросам, касающимся качества Набора «СА72-4-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CA72-4 IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of CA72-4 in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of CA72-4 in blood serum or plasma. The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

CA 72-4, or a carbohydrate antigen 72-4, is a high MW (230-1000 kD) antigen (epitope) associated to gastric and ovarian cancer as well as some other malignancies and not expressed in noticeable quantities in tissues of healthy adult individuals. Quantitative determination of CA 72-4 in serum or plasma is helpful (particularly, in combination with CA 19-9 – see Xema, Cat.# K223) for monitoring of gastric cancer and its therapy, while combined determination of CA 72-4 and CA 125 (see Xema, Cat.# K222) is used for monitoring of ovarian cancer.

Elevated levels of CA 72-4 are often seen in adenocarcinomas of the gastro-intestinal tract, ovaries (mucinous type) and lungs. Besides, raised CA 72-4 is sometimes also seen in patients with benign pathology (chronic inflammation, cysts, fibrosis). That is why, results of CA 72-4 determination should always be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data.

NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy may develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies gives false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated by depleting adsorbents before assaying.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal antibodies to human CA72-4. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies – murine monoclonal Ab to human CA72-4, labelled with peroxidase, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the concentration of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H_2SO_4 . It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Contents of the Kit

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	CA72-4 EIA strips, 8x12 wells polystyrene microwells coated with murine monoclonal Ab to human CA72-4	1	pcs		until exp. date
2 CAL 1-5	Calibrator set, 0.5 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 5; 15; 50; 200 U/ml human CA72-4 diluted in TRIS buffer, pH 7.2-7.4, preservative - 0,1% phenol; also contains blue dye. Ready-to-use.	5	pcs	blue (C1 - colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (0.5 ml) dilution of preselected human serum, with high content of CA72-4 with casein solution; preservative - 0,1% phenol, colourless. Ready-to-use.	1	pcs	purple	2 months
4 CONJ HRP	Conjugate, 11 ml aqueous solution of murine monoclonal to human CA72-4 coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and red dye. Ready-to-use	1	pcs	red	until exp. date
5 DIL	EIA buffer 22 ml phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative; contains blue dye. Ready-to-use.	1	pcs	blue	until exp. date
6 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	until exp. date
7 BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21x, 22 ml aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative.	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp. date Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT
8 STOP	Stop solution, 11 ml 5,0% vol/vol solution of sulphuric acid	1	pcs	colourless	until exp. date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K244I	Instruction CA72-4 EIA	1	pcs		N/A
11 K244Q	QC data sheet CA72-4 EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Microtiter plate shaker. Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 600–800/min
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date. A short-term storage at higher temperatures (nmt 25 °C for nmt 5 days) is allowed (e.g., during transportation).

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens should be tested during the day of sampling. If test run is scheduled for another day, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25 °C) before use.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using DIL (EIA buffer). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement. To obtain reliable results, it is recommended to use several serial dilutions of such a sample.
3	Pipet 100 µl of EIA buffer into each well.
4	Pipet 10 µl of calibrators CAL 1-5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 120 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
7	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
8	Incubate 60 minutes at 37 °C.
9	Wash the strips 5 times.
10	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells. Dispensing of TMB should be completed within 3 minutes.
11	Incubate in a dark place for 10-20 minutes, depending on blue coloration of wells.
12	Dispense 100 µl of STOP into the wells in the same order as TMB.
13	Measure OD (optical density) at 450 nm.
14	Set photometer blank on first calibrator
15	Apply point-by-point method for data reduction.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use external control samples (not included) according to state and federal regulations. The use of external control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

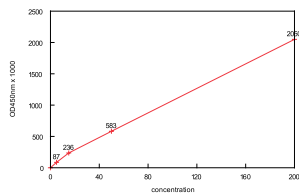
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus CA72-4 concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of CA72-4 in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 U/ml	0.08
CAL 2	5 U/ml	0.17
CAL 3	15 U/ml	0.32
CAL 4	50 U/ml	0.67
CAL 5	200 U/ml	2.13



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutical measures. Each laboratory should establish its own normal range for CA72-4. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below).

NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

NOTE2: if analyte concentration in a specimen is lower than the analytical sensitivity (2 U/ml) or higher than the highest calibrator (200 U/ml), it is recommended to express the results in the following manner: "CA 72-4 concentration is lower than 2 U/ml" or "CA 72-4 concentration is higher than 200 U/ml".

Patient group	Units, U/ml	
	Lower limit	Upper limit
Healthy individuals	-	6

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 2.0 U/ml.

11.2. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different CA72-4 concentrations. Linearity percentages obtained within the range of 5-200 U/ml fell within 90-110%.

11.3. Recovery

Recovery was estimated by assaying a mixed sample (Contol + calibrator 3, 1:1) with known CA72-4 concentration. The recovery percentages ranged from 90% to 110%.

12. LITERATURE

1. DJ Byrne, MC Browning, and A Cuschieri - CA72-4: a new tumour marker for gastric cancer. *Br J Surg*, Sep 1990; 77(9): 1010-3.
2. Ian J. Jacobs and Usha Menon - Progress and Challenges in Screening for Early Detection of Ovarian Cancer. *Mol. Cell. Proteomics*, Apr 2004; 3: 355 - 366.
3. R Hamazoe, M Maeta, T Matsui, S Shibata, S Shiota, and N Kaibara - CA72-4 compared with carcinoembryonic antigen as a tumour marker for gastric cancer. *Eur J Cancer*, Jan 1992; 28A(8-9): 1351-4.

