



# CanAg S100 EIA

REF 708-10

IVD

CE

Instructions d'utilisation. 2010-05

EN	EXPLANATION OF SYMBOLS
BG	ОБЯСНЕНИЕ НА СИМВОЛИТЕ
CS	VÝZNAM SYMBOLŮ
DA	SYMBOLFORKLARING
DE	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE
EL	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ
ES	SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS
ET	SÜMBOLITE SELGITUS
FR	EXPLICATION DES SYMBOLES
HR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
HU	JELMAGYARÁZAT
IT	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI
LT	SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAI
LV	SIMBOLU SKAIDROJUMS
NL	VERKLARING DER SYMBOLEN
NO	SYMBOLFORKLARING
PL	OBJAŚNIENIE SYMBOLI
PT	EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS
RO	SEMNIIFICAȚIA SIMBOLURILOR
RU	ОБОЗНАЧЕНИЯ
SE	SYMBOLFÖRKLARING
SK	VÝZNAM SYMBOLOV
SL	RAZLAGA SIMBOLOV
SR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
TR	SEMBOLLERİN AÇIKLAMALARI



Use By/Годно до/Použitelné do/  
Holdbar til/Verwendbar bis/  
Ημερομηνία λήξης/Fecha  
de caducidad/Kölblik kuni/  
Utiliser jusque/Rok valjanosti/  
Felhasználható/Utilizzare entro/  
Sunaudoti iki/Izlietot līdz/Houdbaar  
tot/Brukes innen/Użyty przed/  
Prazo de validade/Expiră la/  
Использовать до/Använd före/  
Použite 'né do/Uporabno do/  
Upotrebljivo do/Son Kullanna Tarihi

LOT

Batch code/Номер на партида/  
Číslo šarže/Lotnummer/  
Chargenbezeichnung/Αριθμός  
Παρτίδας/Código de lote/Partii  
kood/Code du lot/Kod serije/  
Sarzszzám/Codice del lotto/  
Partijos kodas/Partijas kods/Lot  
nummer/Partikode/Kod partii/  
Código do lote/Număr de lot/  
Номер лота/Lotnummer/Číslo  
šarže/Številka serije/Kod partije/  
Parti Kodu



Date of manufacture/Дата на производство/Datum výroby/  
Produktionsdato/Herstellungsdatum/  
Ημερομηνία παραγωγής/Fecha de fabricación/Valmistamise kuupäev/  
Date de fabrication/Datum proizvodnje/  
Gyártási idő/Data di produzione/  
Pagaminimo data/Ražošanas datums/  
Productiedatum/Fremstillingsdato/  
Data produkcyj/Data de fabrico/Data fabricației/Дата производства/  
Tillverkningsdatum/Dátum výroby/Datum izdelave/Datum proizvodnje/Üretim tarihi



Temperature limitation/  
Температурни граници/  
Teplotní omezení/  
Temperaturbegrænsning/  
Temperaturbegrenzung/  
Περιορισμοί θερμοκρασίας/  
Limites de temperatura/  
Temperatuuri piirang/  
Limite de température/  
Temperaturno ograničenje/  
Hőmérsékletre vonatkozó korlátozás/  
Limiti di temperatura/  
Temperatūriniai apribojimai/  
Temperatūras ierobežojums/  
Temperatuurbepërking/  
Temperaturbegrensninger/  
Temperatury graniczne/  
Limite de temperatura/  
Limite de temperatură/  
Температурный режим/  
Temperaturbegrænsning/  
Teplotné obmedzenie  
Omejitve temperature/  
Temperaturno ograničenje/  
Sıcaklık sınırlaması/



In Vitro Diagnostic Medical Device/  
Медицински уред за диагностика  
ин витро/Lékařský přístroj pro diagnostiku in vitro/Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik/In-vitro-Diagnostikum/  
Ιατροτεχνολογικό προϊόν για διάγνωση  
In Vitro/Dispositivo médico para diagnóstico in vitro/In vitro diagnostiline meditsiiniseade/Dispositif médical de diagnostic in vitro/Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/In vitro orvosdiagnostikai eszköz/Dispositivo medico per test diagnostici in vitro/In Vitro Diagnostiné Medicinos Priemonė/Mediciniska ierīce in vitro diagnostikai/  
In vitro-diagnostisch medisch instrument/  
In vitro diagnostisk medisinsk utstyr/  
Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/  
Dispositivo Médico de Diagnóstico In Vitro/Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro/Только для диагностики In Vitro/Endast för in vitro-diagnostik/  
Zdravotnícka pomôcka na diagnostiku in vitro/In vitro diagnostični pripomoček/  
Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/<96> testleri için yeterlilik içerir



Contains sufficient for <96> tests/Σδържа достатъчно количество за тестове <96>/Lze použít pro <96> testů/Ineholder tilstrækkeligt/Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/Περιεχόμενο επαρκές για «96» εξετάσεις/Contenido suficiente para <96> ensayos/Kogusest piisab <96> testi läbiviimiseks/Contenu suffisant pour «96» tests/Sadrži dovoljno za <96> testova/A doboz tartalma <96> vizsgálat elvégzéséhez elegendő/Contenuto sufficiente per «96» saggi/Turiny's skirtas atlikti <96> tyrimus/Saturs pietiekams <96> testiem/Inhoud voldoende voor «96» testen/til «96» test/Tilstrekkelig innhold for <96> prøver/Wystarczy na wykonanie <96> testów/Conteúdo suficiente para «96» ensaios/Conținut suficient pentru 96 de teste/Содержит достаточные количества для «96» определений/Innehåller tillräckligt till «96» antal tester/Obsah postačuje na tento počet testov: <96>/Vsebinsa zadostuje za <96> testov/Sadržina dovoljna za <96> testova/<96> testleri için yeterlilik içerir



Catalogue number/Каталожен номер/  
Katalogové číslo/Katalognummer/  
Bestellnummer/Αριθμός καταλόγου/  
Número de catálogo/Kataloogi number/  
Numéro de catalogue/Kataloški broj/  
Katalógusszám/Numero di catalogo/  
Katalogo numeris/Numurs katalogā/  
Catalogusnummer/Katalognummer/  
Numer katalogowy/Número do catálogo/  
Număr de catalog/Номер по каталогу/  
Produktnummer/Katalógové číslo/  
Kataloška številka/Kataloški broj/  
Katalog numarası



Consult Instructions for Use/  
Прочетете инструкцията за  
употреба/Konzultujte s návodem  
k použití/Se brugsanvisning/Siehe  
Gebrauchsanweisung/Συμβουλευτείτε  
τις Οδηγίες σχετικά με τη χρήση/  
Consulte las instrucciones de uso/  
Vt kasutusjuhendit/Consulter le mode  
d'emploi/Pročitajte upute za uporabu/  
Olvassa el a használati utasítást/  
Consultare le istruzioni per l'uso/Dél  
naudojimo žiūrėkite instrukcijas/Izlasiet  
lietošanas instrukciju/Raadpleeg de  
instructies voor gebruik/Les instruksene  
før bruk/Sprawdzić w instrukcji użycia/  
Consulte as Instruções de Utilização/  
Consultați instrucțiunile de utilizare/  
Обратитесь к инструкции по  
применению/Se bruksanvisning/  
Prečítajte si návod na používanie/  
Pročitajte uputstvo za upotrebu/  
Kullanım Talimatlarını Bakınız

## CONT

Contents of kit/Съдържание на набора/  
Obsah sady/Kittets indhold/Inhalt des  
Kits/Περιεχόμενα του κιτ/Contenido  
del kit/Komplekt sisaldab/Contenu du  
kit/Sadržaj opreme/A készlet tartalma/  
Contenuto del kit/Rinkinio turinys/  
Komplekta saturs/Inhoud van de set/  
Settets innhold/Zawartość zestawu/  
Conteúdo do kit/Conținutul setului/  
Компоненты набора/Kit innehåll/  
Obsah súpravy/Vsebina kompleta/Sadržaj  
opreme/Kitin içindekiler



Biological risks/Биологическа  
опасност/Biologická rizika/Biologisk  
fare/Biologische Gefahren/Βιολογικοί  
κίνδυνοι/Riesgos biológicos/  
Bioloogilised ohud/Risques biologiques/  
Biološkli rizici/Biológiai kockázatok/Rischi  
biologici/Biologinis pavojus/Bioloģiskais  
risks/Biologische risico's/Biologiske  
risikoer/Zagroženie biologiczne/Riscos  
biológicos/ Biologisk risk/Pericole  
biologice/Биологическая опасность/  
Biologicky rizikové/Biologické riziká/  
Biološkli rizici/Bijolojik riskler

ORIG HUM

Human/С човешки произход/Lidské/  
Human/Human/δείγματα αναφοράς/  
Humano/Inimpăritolu/Humaine/Ljudskog  
porjekla/Humán/Origine Umana/  
Žmogaus kilmės/Cilvēku izcelsmes/  
Human/Menneske/Ludzka/Humano/  
Origine umană/Человеческого  
происхождения/Human/Ludské/  
Humanega izvora/Ljudskog porekla/İnsan

ORIG MOU

From mouse/С миши произход/Мыши/  
Fra mus/der Maus/από ποντίκι/de ratón/  
Hiirtelt/De souris/Mišijeg porjekla/  
Egérból/Murino/Pelés kilmés/No peles/  
Van muizen/Fra mus/Mysia/Do rato/De  
la șoareci/Мышиного происхождения/  
Frán mus/Мыšie/Mišjega izvora/Mišijeg  
porekla/Fareden

ORIG BOV

Bovine/С говежди произход/  
Hovězí/Bovin/Rind/από βοειδή/  
Bovino/Veistelt/Bovine/Rogate stoke/  
Szarvasmarha/Bovino/Jaučio/No  
liellopa/Bovien/Bovin/Wołowy/Bovino/  
Origine bovină/крупного рогатого  
скота/Frán ko/Hovädzie/Govejega  
izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/  
Rozřed'te pomocí/Rekonstitueres med/  
Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/  
Reconstituir con/Lahjendamine/  
Reconstituer avec/Rekonstituiraĵte s/  
Feloldáshoz/Ricostituire con/Atkurti,  
ištirpdant su/Atšķaidīt ar/Reconstitutie  
met/Rekonstitueres med/Odtworzyć  
za pomocą/Reconstituir com/A  
se reconstitui cu/Растворить в/  
Rekonstituera med/Rozried'te pomocou/  
Rekonstituiraĵte z/s/Ponovno formiranje  
sa/Yeniden oluşturulur



Manufacturer/Производитель/Výrobce/  
Producent/Hersteller/Κτασκευαστής/  
Fabricante/Tootja/Fabricant/Proizvođač/  
Gyártó/Fabbricante/Gamintojas/  
Ražotājs/Fabrikant/Produsent/  
Producent/Fabricante/Producător/  
Производитель/Тиллverkare/ Výrobca/  
Izdelovalec/Proizvođač/Üretici

# CanAg S100 EIA

Instructions d'utilisation

Kit de Test Immunoenzymatique

Pour 96 déterminations

## UTILISATION

Le Kit CanAg S100 est destiné à la détermination quantitative de S100B (S100A1B + S100BB) dans le sérum.

## RESUME ET EXPLICATION DU TEST

S100 est une 20 kDa protéine dépendant du S100/calmoduline/troponine C, de la superfamille EF-hand de protéines liant le Calcium. S100 était, à l'origine, isolée du cerveau humain, et considérée comme une protéine spécifique de cellule gliale (1). Aujourd'hui, 20 monomères de la famille S100 ont été identifiés, se basant sur des similarités structurales et fonctionnelles (2, 3). La plupart des protéines S100 existent comme dimères et sont traduit selon un type cellule-spécifique. Deux des monomères S100, désignés S100A1 et S100B (4) sont hautement conservés entre espèces et sont trouvés comme homo- (BB) et hétéro-dimères (A1B) dans les cellules gliales du système nerveux central et dans certaines cellules périphériques par exemple les Cellules de Schwann, mélanocytes, adipocytes, et chondrocytes (5). S100A1B et S100BB sont aussi présents dans les tissus malins, le plus souvent dans le mélanome et dans un degré moindre, dans le gliome, la cellule du carcinome thyroïdien et du carcinome rénal (2).

La détermination de S100B dans le sérum a été montrée comme étant cliniquement utile pour le pronostique et le suivi du traitement des patients diagnostiqués avec un mélanome malin (6-9). Des études suggèrent que S100B puisse être utile dans la gestion des patients ayant eu une atteinte au cerveau à la suite, par exemple, d'une blessure traumatique à la tête, d'une asphyxie périnatale, d'un arrêt cardiaque, d'une opération cardiaque et d'une apoplexie (10-13).

## PRINCIPE DU TEST

Le CanAg S100 EIA est en phase solide. Cet immuno-test non-compétitif, en deux étapes, est basé sur deux anticorps monoclonaux de la souris, spécifiques des deux différents epitopes exprimés dans S100B. Le test détermine, à la fois S100A1B et S100BB, sans réactivité croisée avec les autres formes de S100. Les Calibreurs et les échantillons des patients sont incubés ensemble avec un anticorps monoclonal biotinylé Anti-S100B (MAb) S23, dans des barrettes micro-titres enduites de Streptavidin. S100B, présent dans les Calibreurs ou les échantillons, est adsorbé dans les puits micro-titres enduits de Streptavidin, par l' Anti-S100B Mab biotinylé pendant l'incubation. Les barrettes sont alors lavées et incubées avec la peroxydase du raifort (HRP) étiquetés Anti-S100B MAb S53. Après lavage, le réactif tamponné Substrat / Chromogène (peroxyde d'hydrogène et 3, 3', 5, 5' tétra méthylbenzidine) est ajouté à chaque puits et la réaction enzymatique peut commencer. Pendant la réaction enzymatique une couleur

bleue se développe si l'antigène est présent. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de S100B présent dans les échantillons.

L'intensité de la couleur est déterminée par un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre à 620 nm (ou optionnellement à 405 nm après addition de la Solution d'Arrêt). Les courbes de calibrage sont construites, pour chaque test, en mettant, sous forme graphique, les valeurs d'absorbance contre la concentration de chaque Calibreur. Les concentrations en S100B des échantillons de patients sont alors lues à partir de la courbe de calibrage.

## REACTIFS

- Chaque Kit CanAg S100 EIA contient des réactifs pour 96 tests.
- La date d'expiration du Kit est imprimée sur l'étiquette à l'extérieur de la boîte de Kit.
- Ne pas utiliser le Kit au-delà de la date d'expiration.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots de Kit.
- Conserver les Kits à +2°/+8°C. Ne pas congeler.
- Les Réactifs ouverts sont stables, suivant le tableau ci-dessous, à condition qu'ils n'aient pas été contaminés, qu'ils aient été conservés dans leur conteneur d'origine fermé, qu'ils aient été manipulés comme prescrit et qu'ils aient été remis à +2°/+8°C immédiatement après usage.

Composant	Quantité	Conservation et stabilité après la première ouverture
<b>MICROPLA</b>		
<b>Streptavidin</b>	1 Plaque	+2° / +8°C jusqu'à la date
<b>Plaque micro-titre</b>		d'expiration indiquée sur la plaque
12 barrettes détachables de 8 puits enduits de Streptavidin. Après ouverture, remettre les barrettes non utilisées dans le sachet d'aluminium contenant un déshydratant et ressouder soigneusement pour les garder au sec.		

Composant	Quantité	Conservation et stabilité après la première ouverture
-----------	----------	--

**Calibreurs S100** 6 flacons, lyophilisés 4 semaines +2° / +8°C  
3 mois à -30° C ou en dessous

CAL	S100	A
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	B
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	C
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	D
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	E
-----	------	---

1 x 1 ml

CAL	S100	F
-----	------	---

1 x 1 ml

Les Calibreurs lyophilisés contiennent de la S100B bovine dans une matrice protéinique avec 0.02% de NaN<sub>3</sub> comme conservateur. Ils doivent être reconstitués avec de l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.

**Note:** La concentration exacte de S100B est spécifique au lot et elle est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon.

BIOTIN	Anti-S100
--------	-----------

**Biotine Anti-S100** 1 x 15 ml +2° / +8°C jusqu'à la date  
d'expiration indiquée sur le flacon

La solution de Biotine Anti-S100, anticorps monoclonal de souris, à une concentration approximative de 2 µg/ml, contient un tampon de sel Phosphate (pH 7.2) avec CaCl<sub>2</sub>, de la sérum albumine bovine, de l'immunoglobuline bovine, des agents bloquants, du Tween 20, un colorant inerte bleu et 0.01% méthylisothiazolone (MIT) comme conservateur. La solution est prête à l'emploi.

CONJ	Anti-S100
------	-----------

**Traceur, HRP Anti-S100** 1 x 0.75 ml +2° / +8°C jusqu'à la date  
d'expiration indiquée sur le flacon

La solution d'Arrêt de HRP Anti-S100, anticorps monoclonal de la souris, à la concentration approximative de 20 µg/ml, contient des conservateurs. Elle doit être diluée avec le Traceur Diluant avant utilisation.

Composant	Quantité	Conservation et stabilité après la première ouverture
-----------	----------	--

DIL	CONJ
-----	------

<b>Tracer Diluant</b>	1 x 15 ml	+2° / +8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
-----------------------	-----------	---

Il s'agit d'une solution tampon de sel Phosphate (pH 7.2), qui contient de la sérum albumine bovine, des agents bloquants, des détergents, un colorant inerte bleu, et 0.01 % méthyl-isothiazolone (MIT) comme conservateur. La solution est prête à l'emploi.

SUBS	TMB
------	-----

<b>Substrat-HRP TMB</b>	1 x 12 ml	+2° / +8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
-------------------------	-----------	---

La solution est prête à l'emploi. Elle contient un tampon de peroxyde d'hydrogène et du 3, 3', 5, 5' tétraméthyl-benzidine (TMB).

STOP
------

<b>Solution d'Arrêt</b>	1 x 15 ml	+2° / +8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon
-------------------------	-----------	---

La solution est prête à l'emploi. Elle contient 0.12 M d'acide Chlorhydrique.

WASHBUF	25X
---------	-----

<b>Solution de Lavage Concentrée</b>	1 x 50 ml	+2° / +8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la bouteille
--------------------------------------	-----------	--

Il s'agit d'une solution tampon de sel Tris-HCl avec du Tween 20. Elle contient du Germall II comme conservateur. Elle doit être diluée 25 fois avec de l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.

### Signes d'instabilité

Le Substrat-HRP TMB doit être incolore ou légèrement bleuté. Une couleur bleue indique que le réactif a été contaminé et qu'il doit être détruit.

## **MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI**

### **Pour un usage diagnostique in vitro.**

- Pour un usage professionnel seulement.
- Prière de se référer à la publication N° (CDC) 88-8395 de l'US Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., US) sur les procédures de sécurité dans les laboratoires ou tout autres réglementations locales ou nationales.
- Manipuler les échantillons de patients comme potentiellement infectieux.
- Réactifs contenant de l'Azide de Sodium ( $\text{NaN}_3$ ) comme conservateur: l'Azide de Sodium peut réagir, avec les tubes en plomb et en cuivre, pour former des Azides de métaux hautement explosifs. Lors de l'élimination des déchets, répandre une grande quantité d'eau pour prévenir la formation des Azides.
- Suivre les réglementations locales pour l'élimination et le traitement de tous les déchets.

## **PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS**

Le Test CanAg S100 EIA est destiné à être utilisé avec du sérum. Prélever le sang par veinopuncture et séparer le sérum selon les procédures habituelles. Les échantillons peuvent être conservés à  $+2^\circ / +8^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. Pour des périodes plus longues, conserver les échantillons à  $-20^\circ\text{C}$  ou en dessous. Eviter les congélations répétées et la décongélation des échantillons. Il est permis de décongeler lentement, préférablement à  $+2^\circ / +8^\circ\text{C}$  pendant la nuit et d'amener ainsi les échantillons à température ambiante avant analyse.

## **MODE OPERATOIRE**

### **Matériels nécessaires mais non fournis avec le Kit.**

#### **1. Agitateur-vibreux de plaque micro-titre**

L'agitation vibration doit être de moyenne à forte. L'agitation longitudinale doit être approximativement de 200 strokes/mn et les oscillations de 700 à 900/mn.

#### **2. Dispositif de lavage de microplaques**

Laveuse de microplaques automatique en mesure de réaliser 1 et 6 cycles de lavage et doté d'un volume de remplissage minimum de 350  $\mu\text{L}$ /puits/cycle de lavage.

Le laveuse manuel de barrettes Nunc Immuno-8 est recommandé si un laveuse de microplaques automatique n'est pas utilisé.

#### **3. Spectrophotomètre de plaque micro-titre**

Lecteur avec une longueur d'onde de 620 nm et/ou 405 nm et une échelle d'absorbance de 0 à 3.0.

#### **4. Pipettes de précision**

Les pipettes de précision sont avec des pointes plastiques jetables, pour la distribution de volumes de l'ordre du micro litre et du millilitre. Une pipette à 8 canaux ou un distributeur avec pointes plastiques jetables, pour la délivrance de volumes de 100  $\mu\text{l}$ , est utile mais pas essentiel.

#### **5. Eau Distillée et Désionisée**

Pour la reconstitution des Calibreurs S100 et pour la préparation de la Solution de Lavage.

## Notes de Procédure

1. Une compréhension complète de la notice est nécessaire pour assurer un usage correct du Kit CanAg S100 EIA. Les réactifs, livrés dans le Kit, en font partie intégrante. Ne pas mélanger des réactifs identiques venants de Kits avec un numéro de lot différent. Ne pas utiliser les réactifs du Kit après la date imprimée à l'extérieur de la boîte de Kit.
2. Les Réactifs doivent atteindre la température ambiante (+20° / +25°C) avant leur utilisation. Le test doit seulement être réalisé à une température comprise entre +20°/+25°C pour obtenir des résultats précis. Les échantillons congelés doivent être amenés à température ambiante lentement et doivent être agités, doucement mais complètement, après décongélation.
3. Avant de commencer à pipeter, les Calibreurs et les échantillons de patients, il est recommandé de marquer les barrettes pour faire en sorte d'identifier clairement les échantillons pendant et après le test.
4. La condition d'un lavage efficace et poussé requise pour séparer l'antigène et les réactifs liés et non liés des complexes anticorps-antigène liés en phase solide représente l'une des étapes les plus importantes d'un dosage immunoenzymatique. Afin d'assurer un lavage efficace, assurez-vous que: tous les puits sont complètement remplis de solution de lavage pendant chaque cycle de lavage, jusqu'à ras bord; que la solution de lavage est distribuée à un débit approprié; que l'aspiration des puits entre et après les cycles de lavage est bien complète; et que les puits sont bien vides. Si du liquide reste, renversez la plaque et tapotez légèrement dessus contre du papier absorbant.
  - Dispositif automatique de lavage de barrette: suivez les instructions du fabricant pour un nettoyage et un entretien diligents des barrettes et pour connaître le nombre de cycles de lavage requis avant et après chaque étape d'incubation. Il est vivement recommandé de suivre le mode processuel de barrette ou le mode de lavage en trop-plein avec un volume de 800 µL. Le dispositif d'aspiration/lavage ne doit pas rester avec de la solution de lavage sur des intervalles de temps prolongés parce que les aiguilles pourraient se boucher, ce qui aurait pour résultat une baisse de la distribution et de l'aspiration de liquide.
5. Le Substrat-HRP TMP est très sensible à la contamination. Pour sa stabilité optimale, transférer la quantité requise du flacon, dans un récipient délicatement lavé, préférablement dans un bac jetable en plastique, pour éviter la contamination du réactif. S'assurer de l'utilisation de pipettes à pointes en plastiques, propres et jetables (ou d'une pipette distributrice à pointes).
6. S'assurer de l'utilisation d'une pipette à pointes en plastique, propres et jetables et d'une technique de pipetage correct, lors de la manipulation des échantillons et des réactifs. Eviter de passer au-dessus de la plaque, en maintenant l'embout de pipette légèrement au-dessus du haut du puits et éviter de toucher la barrette plastique ou la surface du liquide. Une technique de pipetage correct, est d'une importance particulière lorsque l'on manipule la solution de Substrat-HRP TMB.

---

Préparation des réactifs	Stabilité des réactifs préparés
--------------------------	---------------------------------

---

**Calibreurs S100**

4 semaines à +2° / +8°C

3 mois à -30°C ou en dessous

Ajouter exactement 1.0 ml d'eau distillée à chaque flacon et mélanger doucement. Il convient de garder le flacon vertical pendant au moins 15 minutes pour la reconstitution.

**Note** : La concentration des Calibreurs est indiquée sur les étiquettes et doit être utilisée pour les calculs des résultats.

---

**Solution de Lavage**

2 semaines à +2° / +25°C

dans un conteneur fermé

Transférer 50 ml de Solution Concentrée de Lavage dans un conteneur propre et diluer 25 fois en additionnant 1200 ml d'eau distillée ou désionisée pour obtenir une Solution de Lavage tamponnée.

---

**Traceur, Solution de Travail**

3 semaines à +2° / +8°C

dans un conteneur fermé

Préparer la quantité requise de Traceur, Solution de Travail, en mélangeant 50 µl de Traceur HRP Anti-S100 avec 1ml de Traceur Diluant, par barrette. ( voir le tableau ci dessous ):

---

No. de Barrettes	Traceur, HRP Anti-S100 (µl)	Traceur Diluant (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

---

S'assurer de l'utilisation d'un flacon propre, en plastique ou en verre, pour la préparation de Traceur, Solution de Travail.

**Alternative:** verser le contenu de Traceur, HRP Anti-S100, dans le flacon de Traceur Diluant et mélanger doucement. S'assurer que tout le contenu de Traceur, HRP Anti-S100, est transféré dans le flacon de Traceur Diluant.

**Note:** le Traceur, Solution de Travail, est stable pendant 3 semaines à +2° / +8°C. Ne pas préparer plus de Traceur, Solution de Travail, qu'il ne pourra en être utilisé pendant cette période et s'assurer qu'elle sera conservée correctement.

### Procédure de test

Réaliser chaque détermination en double pour à la fois les Calibreurs et les échantillons de patients. Une courbe de calibrage doit être réalisée pour chaque test. Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante (+20° / +25°C) avant utilisation.

1. Commencer par la préparation des Calibreurs S100, de la Solution de Lavage et du Traceur, Solution de Travail. Il est important d'utiliser des conteneurs propres et de suivre les instructions soigneusement.
2. Transférer le nombre requis de barrettes de plaque micro-titre sur un portoir à barrettes. (Remettre immédiatement le reste de barrettes dans le sachet aluminium contenant le déshydratant et ressouder soigneusement). Laver chaque barrette une fois avec la Solution de Lavage. Ne pas laver plus de barrettes qu'il ne peut en être manipulé pendant 30 mn.
3. Pipeter 50 µl de Calibreur S100 (CAL A, B, C, D, E, F) et d'échantillons de patients (inconnus – Inc.), dans les puits des barrettes, suivant le plan détaillé ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal A	Cal E	Etc.				
B	Cal A	Cal E					
C	Cal B	Cal F					
D	Cal B	Cal F					
E	Cal C	Inc1					
F	Cal C	Inc1					
G	Cal D	Inc2					
H	Cal D	Inc2					

4. Ajouter 100 µl de Solution de Biotine Anti-S100 à chaque puits, en utilisant une pipette de précision 100 µl (ou une pipette de précision, 100 µl, à 8 canaux). Eviter de passer au-dessus de la plaque, en maintenant l'embout de pipette légèrement au-dessus du haut du puits et éviter de toucher la barrette plastique ou la surface du liquide..
5. Incuber le portoir à barrettes pendant 2 heures ( $\pm$  10 mn) à température ambiante (+20° / +25°C) avec une agitation constante de la plaque à l'aide d'un agitateur à plaque micro-titre.
6. Après la première incubation, aspirer et laver chaque barrette, 3 fois, en utilisant la procédure de lavage décrite dans les Notes de procédure, paragraphe 4.
7. Ajouter 100 µl de Traceur, Solution de Travail, à chaque puits. Utiliser la même procédure de pipetage qu'au paragraphe 4, ci-dessus.
8. Incuber le portoir pendant 1 heure ( $\pm$  5 mn) à température ambiante (+20° / +25°C) avec une agitation constante.

9. Après la seconde incubation aspirer et laver chaque barrette 6 fois, en utilisant la procédure décrite dans les Notes de Procédure, paragraphe 4.
10. Ajouter 100 µl de Substrat-HRP TMB à chaque puits en utilisant la même procédure de pipetage que dans le paragraphe 4, ci-dessus. Le Substrat-HRP TMB doit être ajouté aux puits le plus vite possible et le temps entre les additions, du premier au dernier puits, ne doit pas dépasser 5 mn.
11. Incuber pendant 30 mn ( $\pm$  5 mn) à température ambiante avec une agitation constante. Éviter l'exposition directe à la lumière du jour.
12. Lire l'absorbance à 620 nm, immédiatement, dans un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre.

### **Option**

Si le laboratoire n'a pas accès à un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre capable de lire à 620 nm, l'absorbance peut être déterminée comme suit :

- Alt. 12.** Ajouter 100 µl de Solution d'Arrêt, mélanger et lire l'absorbance à 405 nm, dans un Spectrophotomètre pour plaque micro-titre, dans les 15 mn suivant l'addition de la Solution d'Arrêt.

### **Intervalle de Mesure**

Le Test CanAg S100 EIA mesure des concentrations entre 10 et 3500 ng/l. Si des concentrations de S100B, en dehors de l'intervalle de mesure, sont attendues, il est recommandé de diluer les échantillons avec du sérum normal humain avant analyse.

**Note:** le sérum utilisé pour la dilution doit aussi être analysé pour déterminer la concentration endogène de S100B (voir le paragraphe "Calcul des Résultats").

### **Contrôle Qualité**

CanChek Tumor Marker Control Sera, Niveaux 1 et 2 (disponible séparément, REF 107-20) sont recommandés pour la validation de séries de Test. L'intervalle des résultats attendus est indiqué sur les étiquettes des flacons. Si les valeurs obtenues sont en dehors de l'intervalle spécifié, un contrôle complet des Réactifs et de la performance du Lecteur, doit être fait et les analyses répétées.

### **Matériel de référence**

Puisqu'il n'y a pas de matériels de référence commune pour S100A1B et S100BB, les valeurs des Calibreurs CanAg S100 sont opposées à une série de Standards de Référence maison.

## CALCUL DES RESULTATS

Si un lecteur Spectrophotomètre pour plaque micro-titre, avec calcul des données intégré, est utilisé, se référer au Manuel du lecteur de plaque et créer un programme utilisant la concentration signalée sur l'étiquette de chaque Calibreur S100.

Pour un calcul automatique des résultats de S100, il est recommandé d'utiliser l'une ou l'autre des méthodes suivantes :

- La courbe de cannelure cubique correspond à la méthode. Le Calibreur 0 doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/l.
- La courbe lissée de la cannelure correspond à la méthode. Le Calibreur 0 doit être utilisé comme témoin blanc.
- Interpolation avec une évaluation point par point. Le Calibreur 0 doit être inclus dans la courbe avec une valeur 0 ng/l.
- La courbe quadratique correspond à la méthode. Le Calibreur 0 doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/l.

**Note:** Les méthodes, 4-Paramétrique ou de Régression Linéaire, ne doivent pas être utilisées.

Pour une évaluation manuelle, une courbe de calibrage est construite en mettant sous forme graphique les valeurs d'absorbance (A), valeurs obtenues pour chaque Calibreur S100, contre les concentrations (en ng/l) en S100 correspondantes, voir le graphique ci-dessous. Les concentrations inconnues en S100 peuvent alors être lues, sur la courbe standard, en utilisant la valeur moyenne de chaque échantillon de patient.

Si les échantillons, d'une analyse initiale, donnent des niveaux de S100 plus haut que le Calibreur F (environ 3500 ng/l), ils doivent être dilués au 1/10 avec du sérum normal humain et réanalysés pour obtenir des concentrations précises en S100.

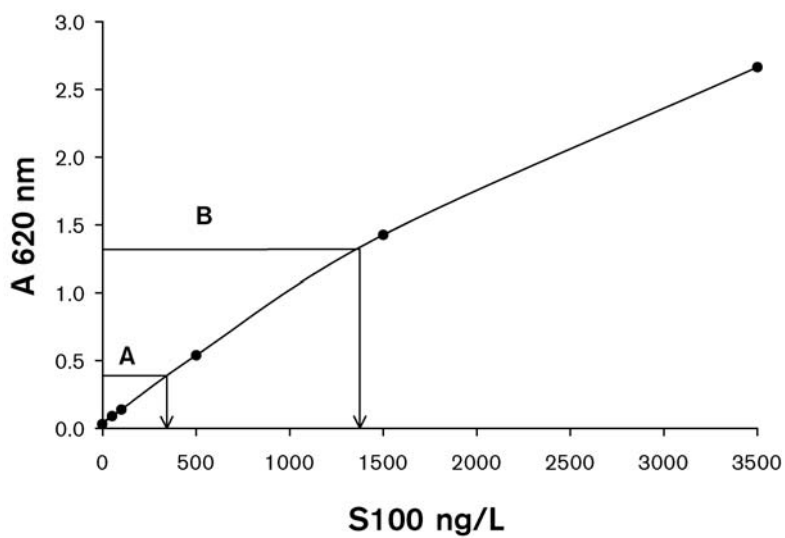
**Note:** Les échantillons utilisés pour la dilution doivent être aussi analysés pour déterminer la concentration endogène en S100.

La concentration en S100, des échantillons non dilués, est calculée comme suit :

$$\text{Dilution 1/10 : } 10 \times ( [\text{S100}]_{\text{Echantillon dilué}} - ( 0.9 \times [\text{S100}]_{\text{Sérum normal}} ) )$$

### Exemple de résultats

Calibreurs	Valeurs pour	Valeur moyenne	S100
Echantillons	Calibreurs	d'absorbance (A)	ng/l
CAL S100 A	0 ng/l	0.041	
CAL S100 B	50 ng/l	0.091	
CAL S100 C	100 ng/l	0.139	
CAL S100 D	500 ng/l	0.540	
CAL S100 E	1500 ng/l	1.425	
CAL S100 F	3500 ng/l	2.663	
Echantillon A		0.352	305
Echantillon B		1.377	1435



*Exemple (ne pas utiliser cette courbe et le tableau ci-dessus, pour déterminer des résultats actuels de tests).*

## LIMITES DE LA PROCEDURE

Le niveau de S100 ne doit pas être utilisé comme évidence absolue de la présence ou de l'absence d'une maladie maligne, et le test S100 ne doit pas être utilisé pour un dépistage du cancer. Les résultats de test doivent être interprétés seulement en conjonction avec d'autres investigations et procédures, dans le diagnostic de maladie et la gestion des patients, et le test S100 ne doit pas remplacer un examen clinique établi.

Des augmentations de S100B dans le sérum doivent être interprétées avec précaution pour des patients exposés à un traumatisme tel que des fractures, des brûlures, une atteinte interne des tissus mous et une opération chirurgicale, vu que ces conditions sont connectées à des libérations de S100B (14).

Les anticorps anti-réactifs (anticorps humain anti-souris (HAMA) ou anticorps hétérophiliques) dans les échantillons de patients, peuvent interférer occasionnellement avec le test, même si des agents bloquants spécifiques sont inclus dans le tampon.

## VALEURS ATTENDUES

S100B a été mesuré sur 269 donneurs de sang en bonne santé. Les plus bas et les plus haut extrêmes de l'intervalle normal ont été examinés en utilisant IFCC, le traitement statistique non-paramétrique recommandé. L'intervalle de référence contient 95% de la fraction centrale de la distribution de référence. Les limites de référence doivent, suivant cela, être estimées comme les 97.5% (+haut) fractiles.

Des estimations non-paramétriques donnent:

	<b>Moyenne</b>	<b>SD</b>	<b>Référence limite</b>
donneurs de sang n=269	54 ng/L	15.6 ng/L	90 ng/L

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir sa propre échelle normale pour prendre en compte les facteurs environnementaux locaux comme le régime alimentaire, le climat, les conditions de vie, la sélection des patients, etc.

## CHARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE

### Précision

La précision totale est déterminée, suivant la Directive NCCLS EP5-A (15), en utilisant quatre niveaux de sérum congelés de groupes humains contenant du S100 additionné et 22 combinaisons de réactifs différents CanAg S100 EIA. Chaque échantillon est pipeté au hasard ( n = 2 / analyses) et analysés deux fois par jour sur 20 jours.

<b>Echantillon</b>	<b>Répliques</b>	<b>Moyenne (ng/l)</b>	<b>Série SD (ng/l)</b>	<b>Série CV %</b>	<b>Entre-jour SD (ng/l)</b>	<b>Entre-jour CV %</b>
S100 1	80	70	2	2.5	2	2.2
S100 2	80	302	5	1.6	8	2.5
S100 3	80	1440	20	1.4	21	1.5
S100 4	80	2260	30	1.3	45	2.0

### Limite de Détection

La limite de détection du Test CanAg S100 EIA est  $\leq 10$  ng/l définis comme la concentration correspondant à la moyenne des valeurs pour le Calibreur 0, S100, plus 2 Déviations Standards suivant la formule :

$$\frac{2 \times \text{SD CAL A}}{\text{OD CAL B} - \text{OD CAL A}} \times [\text{CAL B}]$$

### Récupération

Des échantillons pointus sont préparés en ajoutant de l'antigène humain S100 à des échantillons de sérum normal. La récupération de l'antigène ajouté est dans l'intervalle 97–105 %.

**Note:** Les études de récupération ne doivent pas être faites en utilisant les Calibreurs des Kits.

### Effect Crochet

On n'a pas observé d'Effet Crochet avec des échantillons à des concentrations allant jusqu'à 150 000 ng/L. **Note:** Dans le cas d'échantillons de concentration très élevée, la couleur du Substrat peut changer du bleu au légèrement vert (et éventuellement jaune pour des échantillons de concentration extrêmement élevée). Ceci peut entraîner des absorbances à 620 nm faussement basses et dans des cas extrêmes, l'absorbance peut tomber dans l'intervalle de la courbe de calibrage et être considérée comme un Crochet.

### Linéarité

Les échantillons de patients sont dilués en série avec du sérum normal humain et analysés. Les valeurs obtenues sont dans l'intervalle  $\pm 10\%$  des valeurs attendues.

### Spécificité

Le Test CanAg S100 EIA est basé sur deux anticorps monoclonaux de la souris, spécifiques pour deux différents epitopes exprimés dans S100B, le capteur MAB S23 et le détecteur MAB S53. Finalement le test détermine, à la fois S100A1B et S100BB, sans réactivité croisée avec les autres formes de S100. La Directive NCCLS, EP7-P (16) est utilisée pour déterminer les sources possibles d'interférence. Les substances suivantes, avec leurs concentrations respectives, sont testées et trouvées comme n'interférant pas avec le test.

---

#### Concentration n'ayant pas d'interférence significative ( $\pm 10\%$ )

---

Lipémie ( Intralipid® )	10 mg/ml
Bilirubine, non conjuguée	0.6 mg/ml
Hémoglobine	3.9 mg/ml

---

### **Comparaison de méthode**

Le test CanAg S100 EIA est comparé au Sangtec 100. Quatre vingt dix huit échantillons de sérum humain de patients, ayant un mélanome malin, dont les valeurs s'étalent de 0 à 8000 ng/l, sont mesurés et les résultats sont soumis à l'analyse de Régression Linéaire :

$$\text{CanAg S100} = 0.4 \times \text{Sangtec 100} + 0.03 \quad r=0.99$$

### **GARANTIE**

Les données de performance, présentées ici, sont obtenues en utilisant la procédure du test décrite. Tout changement ou modification de la procédure, non recommandé par Fujirebio Diagnostics, peut affecter les résultats, dans ce cas, Fujirebio Diagnostics rejette toutes les garanties explicites, implicites ou incluant statutairement la garantie implicite de commercialisation et d'adaptation à l'utilisation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins:structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K. et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T. et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E., et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A. et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT., et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H. et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T. et al.,(2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicentre study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D. (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Anderson R. et al., (2001) High serum S100B levels for trauma patients without head injuries *Neurosurgery* 48: 1255-1258
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



---

CanAg® est une Marque Déposée de Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB

Elof Lindälvsgata 13

SE-414 55 Göteborg

Sweden

Phone + 46 31-85 70 30

Fax + 46 31-85 70 40

[info@fdab.com](mailto:info@fdab.com)

[www.fdab.com](http://www.fdab.com)

