



DCM054-9
Ed. 01/2015

CA125 ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del CA125 in siero o plasma umano

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO054

DESTINAZIONE D' USO

Il kit Diametra CA125 ELISA è un saggio immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa dell'antigene tumorale CA125 nel siero o plasma umano.

Il kit CA125 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

CA125 è un marker tumorale, una glicoproteina di elevato peso molecolare (> 200.000).

È il più noto indicatore per il cancro ovarico, ma i livelli di CA125 possono essere elevati in altri tumori maligni, compreso quelli dell'endometrio, delle trombe di Fallopio, polmonari, del seno e del tratto gastrointestinale. CA125 può anche essere elevato in un certo numero di casi relativamente benigni, quali l'endometriosi, in parecchie malattie dell'ovaia e nella gravidanza. Inoltre tende ad essere elevato in caso di infiammazione della zona addominale, sia cancerosa che benigna. Quindi, CA125 non è perfettamente specifico per il cancro né è perfettamente sensibile poiché non tutti i pazienti con il cancro presentano elevati livelli di CA125 nel sangue.

CA125 è approvato clinicamente, come marcatore, per quanto concerne la risposta al trattamento e la predizione della prognosi dopo il trattamento. È particolarmente utile per la rilevazione della ricaduta di cancro ovarico. Il potenziale ruolo nell'individuazione tempestiva di cancro ovarico è discutibile ed ancora non è stato adottato per la presenza di donne asintomatiche.

I livelli elevati nelle donne in post-menopausa sono solitamente un'indicazione che ulteriori screening sono necessari. In donne in pre-menopausa, risultati positivi sono spesso dovuti alle cause benigne.

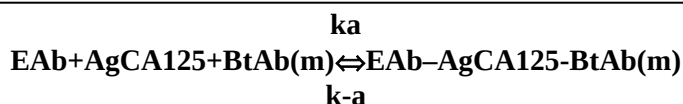
2. PRINCIPIO DEL METODO

I requisiti essenziali per un saggio immunoenzimatico sono anticorpi ad alta affinità e specificità (enzima coniugato e immobilizzato), con differenti e distinti epitopi.

In questo metodo l'anticorpo si lega alla superficie del pozzetto attraverso l'interazione della streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti CA125 monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima HRP

(perossidasi di rafano); entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi. Nei pozzetti della micropiastra la reazione tra antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtAb(m) = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

AgCA125 = antigene nativo (quantità variabile)

EAb = anticorpo marcato con enzima (quantità in eccesso)

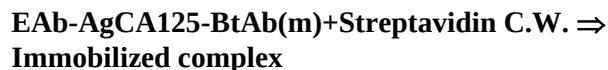
EAb-AgCA125-BtAb(m) = complesso sandwich antigene-anticorpo

k_a = costante di associazione

k_{-a} = costante di dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad affinità tra la Streptavidina e l' anticorpo biotinilato.

Questa interazione viene mostrata di seguito:



StreptavidinC.W. = Streptavidina immobilizzata nel pozzetto

Immobilized complex = Complesso a sandwich immobilizzato nel pozzetto

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata all'anticorpo è separata dall'antigene non legato mediante un lavaggio. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

L'attività dell'enzima HRP è quantificata mediante una reazione con un substrato che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-

risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/5406-0
CAL1	REF DCE002/5407-0
CAL2	REF DCE002/5408-0
CAL3	REF DCE002/5409-0
CAL4	REF DCE002/5410-0
CAL5	REF DCE002/5411-0

2. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo anti CA125 coniugato a perossidasi di rafano (HRP) e anticorpo anti CA125 biotinilato

REF DCE002/5402-0

3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con Streptavidina

REF DCE002/5403-0

4. TMB Substrate (1 flacone, 15mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

5. Stop solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

6. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006B-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Il CA125 ha una bassa sensibilità e specificità clinica come marker tumorale. Clinicamente un elevato valore di CA125 da solo non rappresenta un valore diagnostico come test per il cancro e dovrebbe essere usato solo in associazione con altre manifestazioni cliniche e parametri diagnostici.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta

della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.

- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono stati prodotti utilizzando una soluzione purificata con affinità per CA125 >99%. La preparazione è stata calibrata con il metodo Centocor CA125 IRMA test.

I sieri di riferimento contengono antigeni CA125 alle seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	0	15	50	100	200	400

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C. I Calibratori sono pronti all'uso.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni di siero o plasma umano, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Campioni con concentrazioni di CA125 oltre 400 U/mL devono essere diluiti (per esempio 1:10 con un siero di donatore sano con CA125 < 5 U/mL) e analizzati di nuovo. La concentrazione del siero è ottenuta moltiplicando i risultati per il fattore di diluizione.

Se analizzati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,050 mL dei campioni.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Campione		25 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione e lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CA125 per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Si dovrebbero compilare le tabelle di controllo qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Per accertare il trend dovrebbero essere impiegati metodi statistici adeguati. Il laboratorio dovrebbe fissare i

limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato nelle condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Per determinare il motivo delle variazioni si dovrebbero usare reagenti freschi.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0 - C_5) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun Calibratore (C_0 - C_5) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in U/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

	CA125
Soggetti sani non in gravidanza	< 35 U/mL

Il CA125 risulta elevato nel siero nell'1% delle donne sane, nel 3% delle donne con patologia benigna all'utero, nel 6% di pazienti con condizioni non-neoplastiche (comprese, ma non limitate a donne al primo trimestre di gravidanza, con mestruazioni, fibrosi uterina dell'endometrio, salpingite acuta, malattie epatiche e infiammazioni del peritoneo e del pericardio).

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (18x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 10,0\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo con Kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 9,9\%$.

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di CA125 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 1,7 U/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Specificità

Per valutare la specificità della coppia di antisieri sono state aggiunte quantità massicce di possibili cross-reagenti a pool di sieri a concentrazione nota e testati in parallelo con i sieri.

Sostanza	U.M.	Concentrazione	Cross Reattività
CA125	U/mL	---	100,0%
PSA	mg/mL	1,0	N.D.
β -HCG	ng/mL	250	N.D.
HCG	U/mL	5000	N.D.
LH	U/mL	1000	N.D.
CA-19-9	U/mL	1000	N.D.
CA-15-3	U/mL	1000	N.D.

In accordo con i dati, la coppia di anticorpi risulta essere altamente specifica per il solo CA125.

10.4. Correlazione

Il kit Diametra CA125 ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 142 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 0,987 x + 1,019$$

$$r^2 = 0,984$$

$$y = \text{CA125 kit commerciale}$$

$$x = \text{CA125 kit Diametra}$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

- 1) Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)
- 2) Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)
- 3) Harrison, Principles of Internal Medicine., McGraw Hill Book Company, New York. 12th. Ed.
- 4) Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994)
- 5) Hasholzner U, Tumor Diagnosis & Ther 15:114-117 (1994)
- 6) Hasholzner U, Int J Cancer 69:329-34 (1996)
- 7) Ovarian Cancer–NIH Conference. JAMA 273:491-497 (1995)
- 8) Daoud E. Clin Chem 37:1968-74 (1991)
- 9) De Bruijn HWA, Curr Opin Gynecol 9:8-13 (1997)
- 10) Sikorska H, Cancer Detection Preview 12:321-355 (1988)
- 11) NIH CA125 Ann.Intern.Med. 94:407-409 (1981)

Ed. 01/2015

DCM054-9

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria, 15 –

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06083 SPELLO (PG)

Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM054-9
Ed. 01/2015

CA125 ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of CA125 in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO054

INTENDED USE

Diametra CA125 ELISA kit is an immunoenzymatic colorimetric method for the quantitative determination of the tumoral antigen CA125 concentration in human serum or plasma.

CA125 ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

CA125 is a tumour marker, it is a glycoprotein as high molecular weight entity (MW > 200,000).

It is best known as a marker for ovarian cancer, but it may also be elevated in other malignant cancers, including those originating in the endometrium, fallopian tubes, lungs, breast and gastrointestinal tract. CA125 may also be elevated in a number of relatively benign conditions, such as endometriosis, several diseases of the ovary, and pregnancy. It also tends to be elevated in the presence of any inflammatory condition in the abdominal area, both cancerous and benign. Thus, CA125 is not perfectly specific for cancer nor is it perfectly sensitive since not every patient with cancer will have elevated levels of CA125 in the blood.

CA125 is clinically approved for following the response to treatment and predicting prognosis after treatment. It is especially useful for detecting the recurrence of ovarian cancer. Its potential role for the early detection of ovarian cancer is controversial and has not yet been adopted for widespread screening efforts in asymptomatic women.

Elevated levels in post-menopausal women are usually an indication that further screening is necessary. In pre-menopausal women, the test is less reliable as values are often elevated due to a number of non-cancerous causes.

2. PRINCIPLE

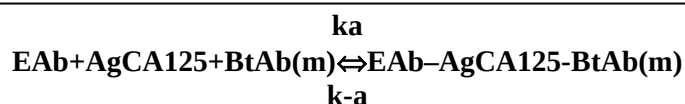
The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this method, CA125 calibrators, patient specimens and/or controls containing the native antigen are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies are added and the reactants mixed: these antibodies have high

affinity and specificity and are detected against distinct and different epitopes of CA125.

Reaction between the various CA125 antibodies and native CA125 occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



BAb(m) = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

AgCA125 = native antigen (variable quantity)

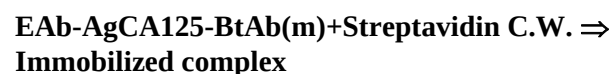
EAb = enzyme labelled antibody (excess quantity)

EAb-AgCA125-BtAb(m) = antigen-antibodies sandwich complex

k_a = rate constant of association

k_a = rate constant of dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



Streptavidin C.W. = Streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = sandwich complex bound to the well.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. By utilizing several different serum references of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF	DCE002/5406-0
CAL1	REF	DCE002/5407-0
CAL2	REF	DCE002/5408-0
CAL3	REF	DCE002/5409-0
CAL4	REF	DCE002/5410-0
CAL5	REF	DCE002/5411-0

2. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Antibody anti CA125 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and antibody anti CA125 biotinylated

REF **DCE002/5402-0**

3. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Microplate coated with Streptavidin

REF **DCE002/5403-0**

4. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF **DCE004-0**

5. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF **DCE005-0**

6. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF **DCE006B-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed

through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- CA125 has a low clinical sensitivity and specificity as a tumour marker. Clinically an elevated CA125 value alone is not of diagnostic value as a test for cancer and should only be used in conjunction with other clinical manifestations (observations) and diagnostic parameters.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are made using a >99% pure affinity purified preparation of CA125. The preparation is calibrated against Centocor CA125 IRMA test.

The references CA125 Antigen has the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	0	15	50	100	200	400

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C. The Calibrators are ready to use.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of the Sample

The specimens can be human serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed. For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

To obtain the serum, the blood should be collected in a plain redtop venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

Patient specimens with CA125 concentrations above 400 U/mL may be diluted (for example 1:10 or higher) with normal male serum (CA125 < 5 U/mL) and re-assayed. The sample's concentration is obtained by multiplying the result by the dilution factor.

When assayed in duplicate, 0.050 mL of the specimen is required.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22±28°C) for 1 hour. Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of CA125 for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in U/mL.

9. REFERENCE VALUES

	CA125
Healthy and non-pregnant subjects	< 35 U/mL

The serum CA125 is elevated in 1% of normal healthy women, 3% of normal healthy women with benign ovarian diseases, 6% of patients with non-neoplastic conditions (including but not limited to first trimester pregnancy, menstruation, endometriosis, uterine fibrosis, acute salpingitis, hepatic diseases and inflammation of peritoneum or pericardium).

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (18x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 10.0\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (20x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 9.9\%$.

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA125 that can be distinguished from the Calibrator zero is 1.7 U/mL at the 95% confidence limit.

10.3. Specificity

In order to test the specificity of the antibody pair used massive concentrations of possible cross-reactants were added to known serum pools and assayed in parallel with the base sera.

Substance	U.M.	Concentration	Cross Reactivity
CA125	U/mL	---	100.0%
PSA	mg/mL	1.0	N.D.
β -HCG	ng/mL	250	N.D.
HCG	U/mL	5000	N.D.
LH	U/mL	1000	N.D.
CA-19-9	U/mL	1000	N.D.
CA-15-3	U/mL	1000	N.D.

According to data, the antibody pair was found to be highly specific for CA125 only.

10.4. Correlation with RIA

Diametra CA125 ELISA kit was compared to another commercially available CA125 assay. 142 Serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.987x + 1.019$$

$$r^2 = 0.984$$

$$y = \text{CA125 commercial kit}$$

$$x = \text{CA125 Diametra kit}$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- 1) Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)
- 2) Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)
- 3) Harrison, Principles of Internal Medicine., McGraw Hill Book Company, New York. 12th. Ed.
- 4) Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994)
- 5) Hasholzner U, Tumor Diagnosis & Ther 15:114-117 (1994)
- 6) Hasholzner U, Int J Cancer 69:329-34 (1996)
- 7) Ovarian Cancer-NIH Conference. JAMA 273:491-497 (1995)
- 8) Daoud E. Clin Chem 37:1968-74 (1991)
- 9) De Bruijn HWA, Curr Opin Gynecol 9:8-13 (1997)
- 10) Sikorska H, Cancer Detection Preview 12:321-355 (1988)
- 11) NIH CA125 Ann.Intern.Med. 94:407-409 (1981)

Ed. 01/2015

DCM054-9

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria, 15 –

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06083 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM054-9
Ed. 01/2015

CA125 ELISA

Determinación inmunoenzimática de CA125 en suero o plasma humano

para análisis de rutina

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO054

USO PREVISTO

Determinación cuantitativa del antígeno tumoral CA125 presente en el suero o plasma humano, mediante ensayo inmunoenzimático en microplaca.

El kit CA125 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

CA125 es un marcador tumoral, una glicoproteína de elevado peso molecular (> 200.000).

Es el indicador más conocido para el cáncer ovárico, pero los niveles de CA125 pueden ser elevados en otros tumores malignos, incluidos los del endometrio, de las trompas de Falopio, pulmonares, de mama o del tracto gastrointestinal. El CA125 también puede ser elevado en un determinado número de casos relativamente benignos, como la endometriosis, en varias enfermedades del ovario y durante el embarazo. Además, tiende a ser elevado en caso de inflamación de la zona abdominal, tanto cancerosa como benigna. Por lo tanto, el CA125 no es completamente específico para el cáncer ni es totalmente sensible, puesto que no todos los pacientes con cáncer presentan niveles elevados de CA125 en la sangre.

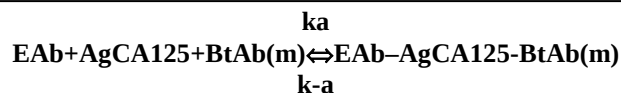
El CA125 está aprobado clínicamente como marcador por lo que respecta a la respuesta al tratamiento y a la predicción del pronóstico tras el tratamiento. Resulta especialmente útil para la detección de la recaída del cáncer ovárico. El papel potencial en la detección temprana del cáncer de ovario es discutible y aún no se ha adoptado por la presencia de mujeres asintomáticas.

Los niveles elevados en mujeres en postmenopausia son solo una indicación de que se requieren cribados posteriores. En mujeres en premenopausia, los resultados positivos suelen deberse a las causas benignas.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los requisitos esenciales para un ensayo inmunoenzimático son anticuerpos de alta afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados), con epítopos distintos. En este procedimiento, el anticuerpo se une a la superficie del pocillo mediante la interacción de la estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso,

anticuerpos anti-TSH monoclonales biotinilados o bien anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítopos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble. La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtAb(m) = anticuerpo monoclonal biotinilado (cantidad en exceso)

AgCA125 = antígeno nativo (cantidad variable)

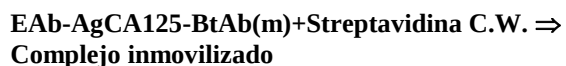
EAb = anticuerpo marcado con enzima (cantidad en exceso)

EAb-AgCA125-BtAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpo

ka = constante de asociación

k-a = constante de disociación

Al mismo tiempo, mediante la interacción de alta afinidad con la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado, el complejo se deposita en el pocillo. Esta interacción se muestra a continuación:



Streptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = complejo sándwich inmovilizado en el pocillo

Tras lograr el equilibrio, la fracción de anticuerpos unida se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo presente. Usando distintos sueros de referencia con valores conocidos de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta y calcular la dosis de un suero desconocido.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/5406-0
CAL1	REF	DCE002/5407-0
CAL2	REF	DCE002/5408-0
CAL3	REF	DCE002/5409-0
CAL4	REF	DCE002/5410-0
CAL5	REF	DCE002/5411-0

2. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo anti CA125 conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y anticuerpo anti CA125 biotinilado
REF DCE002/5402-0

3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con estreptavidina
REF DCE002/5403-0

4. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)
REF DCE004-0

5. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)
REF DCE005-0

6. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L REF DCE006B-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 3 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- El CA125 tiene baja sensibilidad y especificidad clínica como marcador tumoral. Clínicamente, un valor elevado de CA125 por sí solo no representa un valor de diagnóstico como ensayo para el cáncer y debería usarse solamente en combinación con otras manifestaciones clínicas y otros parámetros de diagnóstico.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.

- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores, que contienen suero humano, se han producido utilizando una solución purificada con afinidad para CA125 >99%. La preparación se ha calibrado con el método del ensayo Centocor CA125 IRMA.

Los sueros de referencia que contienen antígenos CA125 tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	0	15	50	100	200	400

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2÷8°C. Los Calibradores son listo para usar.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras de suero o plasma humano, y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar las muestras para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2÷8°C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para esta determinación no deben usarse muestras microbiológicamente contaminadas, muy lipémicas o hemolizadas.

Las muestras con concentraciones de CA125 superiores a 400 U/mL deben diluirse (por ejemplo,

1:10 con un suero de donante sano con CA125 < 5 U/mL) y analizarse de nuevo. La concentración de suero se obtiene multiplicando los resultados por el factor de dilución.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,050 mL de las muestras.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra		25 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces .			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de CA125 para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Para determinar el motivo de las variaciones se deben usar reactivos frescos.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada Calibrador (C_0 - C_5) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos Calibrador (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en U/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

	CA125
Mujeres sanas no embarazadas	< 35 U/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

El CA125 resulta elevado en el suero del 1% de las mujeres sanas, el 3% de las mujeres con patología benigna de útero, el 6% de pacientes con condiciones no neoplásicas (incluyendo pero no limitándose a mujeres en el primer trimestre de embarazo, con menstruación, fibrosis uterina del endometrio, salpingitis aguda, enfermedades hepáticas e inflamaciones del peritoneo y del pericardio.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo ensayo se ha determinado replicando (18x) la medición de tres sueros de control distintos.

La variabilidad intraensayo es $\leq 10,0\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos ensayos se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 9,9\%$.

10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de CA125 medible que puede distinguirse del Calibrador cero es 1,7 U/mL con un límite de confianza del 95%.

10.3. Especificidad

Para evaluar la especificidad del par de antisueros se añadieron grandes cantidades de posibles reactivos cruzados a un pool de sueros con concentración conocida y se analizaron en paralelo con los sueros.

Sustancia	U.M.	Concentración	Reactividad cruzada
CA125	U/mL	---	100,0%
PSA	mg/mL	1,0	N.D.
β -HCG	ng/mL	250	N.D.
HCG	U/mL	5000	N.D.
LH	U/mL	1000	N.D.
CA-19-9	U/mL	1000	N.D.
CA-15-3	U/mL	1000	N.D.

Según los datos, el par de anticuerpos ha resultado ser altamente específico para CA125 solo.

10.4. Correlación

El kit CA125 ELISA (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 142 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$y = 0,987x + 1,019$$

$$r^2 = 0,984$$

$$y = \text{kit CA125 comercial}$$

$$x = \text{kit CA125 Diametra}$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)
- 2) Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)
- 3) Harrison, Principles of Internal Medicine., McGraw Hill Book Company, New York. 12th. Ed.
- 4) Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994)
- 5) Hasholzner U, Tumor Diagnosis & Ther 15:114-117 (1994)
- 6) Hasholzner U, Int J Cancer 69:329-34 (1996)
- 7) Ovarian Cancer–NIH Conference. JAMA 273:491-497 (1995)
- 8) Daoud E. Clin Chem 37:1968-74 (1991)
- 9) De Bruijn HWA, Curr Opin Gynecol 9:8-13 (1997)
- 10) Sikorska H, Cancer Detection Preview 12:321-355 (1988)
- 11) NIH CA125 Ann.Intern.Med. 94:407-409 (1981)

Ed. 01/2015

DCM054-9

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39.02.2139184

Fax +39.02.2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)
Italy

Tel. +39.0742.24851

Fax +39.0742.316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs