



DCM055-11
Ed. 01/2016

CA 15-3 ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del CA 15-3 nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO055

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del CA 15-3 nel siero o plasma umano.

Il kit CA 15-3 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

CA-15-3, è un'abbreviazione per l'antigene tumorale 15-3. I livelli di CA 15-3 sono molto utili per seguire il corso del trattamento in donne a cui è stato diagnosticato il cancro al seno, particolarmente in caso di stadi avanzati. I livelli di CA 15-3 sono raramente elevati in donne con il cancro al seno della fase iniziale.

I cancri dell'ovaia, del polmone e della prostata possono anche causare l'aumento dei livelli di CA 15-3. Livelli elevati del CA 15-3 possono essere associati a patologie benigne, quali il tumore benigno al seno o malattie ovariche, endometriosi, infiammazioni pelviche ed epatite.

La gravidanza e la lattazione possono anche indurre un aumento dei livelli di CA 15-3. Il CA 15-3 è più utile per il monitoraggio dei pazienti nella fase post-operatoria, in particolare nel caso di malattie metastatiche. Il 96% dei pazienti con ricomparsa locale e sistemica hanno elevato CA 15-3; questo dato può essere usato per predire la ricomparsa prima dei mezzi clinici e radiologici. Un incremento del 25% del CA 15-3 serico è associato ad una progressione del carcinoma. Un decremento del 50% del CA 15-3 serico è associato ad una risposta al trattamento. Il CA 15-3 è più sensibile del CEA nella diagnosi delle ricadute del tumore al seno. In combinazione con il CA 125 è utile nella diagnosi precoce del tumore alle ovaie. I livelli di CA 15-3 aumentano nei tumori al colon polmoni ed epatici.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit CA 15-3 ELISA è basato sulla cattura simultanea del CA 15-3 umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastrella, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente, l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H_2O_2) ed il TMB

Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di CA 15-3 presente nel campione.

La concentrazione del CA 15-3 nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 2 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/5506-0
CAL1	REF DCE002/5507-0
CAL2	REF DCE002/5508-0
CAL3	REF DCE002/5509-0
CAL4	REF DCE002/5510-0
CAL5	REF DCE002/5511-0

2. Control (1 flacone, 2 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/5503-0

3. Serum diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 50 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE018/5518-0

4. Conjugate (1 flacone, 22 mL)

Anticorpo monoclonale anti CA 15-3 coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/5502-0

5. Coated Microplate (1 micropiastrella breakable)

Anticorpo monoclonale anti CA 15-3 adsorbito nella micropiastrella

REF DCE002/5503-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4

REF DCE054-0

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 5 (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.
- 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.
- Questo metodo permette la determinazione del CA 15-3 da 0,5 a 240,0 U/mL.

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.
- 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'addizione del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'addizione della Stop Solution. L'addizione 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 hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	0	15	30	60	120	240

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

Non diluire i Calibratori ed il Controllo; sono già stati pre-diluiti e sono pronti all'uso.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

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 esser 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.

Tutti i campioni devono essere diluiti 1:50 con Serum diluent, come nell'esempio seguente:

Siero	20 µL
Serum Diluent	980 µL

Mescolare gentilmente.

Il Controllo è pronto all'uso.

NB: per campioni con concentrazioni superiori a 240 U/mL diluire ulteriormente il campione con Sample diluent (attenzione: tenere conto di questa diluizione nel calcolo del risultato finale).

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	Campioni /Controllo	Bianco
Campioni diluiti/ Controllo		200 µL	
Calibratore C ₀ -C ₅	200 µL		
Incubare a 37°C per 1 ora senza coprire la piastra. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto. Lavare 5 volte ogni pozzetto con 0,3 mL 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.			
Coniugato	200 µL	200 µL	
Incubare a 37°C per 1 ora senza coprire la piastra. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto. Lavare 5 volte ogni pozzetto con 0,3 mL 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.			

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare a temperatura ambiente (22-28°C) per 15 minuti 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 QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CA 15-3 per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C₀ - C₅) 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

	CA 15-3
Donne sane non in gravidanza	< 35 U/mL

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 Fabbrikante 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 kit è stata determinata replicando (15x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 7,5\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di cinque differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 11,4\%$.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 25 - 50 - 100 U/mL di antigene ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $106,61\% \pm 8,86\%$.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 - 16 volte ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $103,71\% \pm 8,56\%$.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di CA 15-3 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,40 U/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate:

Antigene	Concentrazione	% Cross-reactivity
CA 15-3	---	100,0%
CA 125	1000 U/mL	N.D.
CA 19-9	1000 U/mL	N.D.
PSA	1000 ng/mL	N.D.
PAP	1000 ng/mL	N.D.
AFP	10000 ng/mL	N.D.
CEA	1000 ng/mL	N.D.

10.5. Correlazione

Il kit CA 15-3 ELISA Diametra è stato comparato con un metodo di riferimento disponibile in commercio. Sono stati testati 54 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 0,86x + 2,66$$

$$r^2 = 0,838$$

$$y = \text{CA 15-3 Diametra}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aziz DC, et al Specialty Laboratories, (1991)
- 2) Aziz DC. A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
- 3) Aziz DC, et al J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
- 4) Clark GM, et al N Engl J Med 320:627-33 (1989)
- 5) Elledge RM, et al Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
- 6) Foekens JA, et al Cancer Res 50:3832-7 (1990)
- 7) Isola J, et al J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
- 8) Kute TE, et al Cancer Res 52:198-203 (1992)
- 9) McGuire WL, et al J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
- 10) Nicholson S, et al Br J Cancer 63:146-50 (1991)
- 11) Somerville JE, et al J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
- 12) Ueronese S, et al Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
- 13) Lotnick M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed. 01/2016

DCM055-11

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



DCM055-11
Ed. 01/2016

CA 15-3 ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of CA 15-3 in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO055

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CA 15-3 concentration in human serum or plasma.

CA 15-3 ELISA is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

CA-15-3, is an abbreviation for cancer antigen 15-3.

CA 15-3 levels are most useful in following the course of treatment in women diagnosed with breast cancer, especially advanced breast cancer. CA 15-3 levels are rarely elevated in women with early stage breast cancer.

Cancers of the ovary, lung, and prostate may also raise CA 15-3 levels. Elevated levels of CA 15-3 may be associated with non-cancerous conditions, such as benign breast or ovarian disease, endometriosis, pelvic inflammatory disease, and hepatitis. Pregnancy and lactation can also cause CA 15-3 levels to rise.

CA 15-3 is most useful for monitoring patients post-operatively for recurrence, particularly metastatic diseases. 96% of patients with local and systemic recurrence have elevated CA 15-3, which can be used to predict recurrence earlier than radiological and clinical criteria. A 25% increase in the serum CA 15-3 is associated with progression of carcinoma. A 50% decrease in serum CA 15-3 is associated with response to treatment. CA 15-3 is more sensitive than CEA in early detection of breast cancer recurrence. In combination with CA-125, CA 15-3 has been shown to be useful in early detection of relapse of ovarian cancer. CA 15-3 levels are also increased in colon, lung and hepatic tumours.

2. PRINCIPLE

CA 15-3 ELISA test is based on simultaneous binding of human CA 15-3 to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates, the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the separation bound-free is obtained with a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is proportional to CA 15-3 concentration in the sample.

CA 15-3 concentration in the sample is calculated using a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 2 mL each)

CAL0	REF DCE002/5506-0
CAL1	REF DCE002/5507-0
CAL2	REF DCE002/5508-0
CAL3	REF DCE002/5509-0
CAL4	REF DCE002/5510-0
CAL5	REF DCE002/5511-0

2. Control (1 vial, 2 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/5503-0

3. Serum diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L

REF DCE018/5518-0

4. Conjugate (1 vial, 22 mL)

Monoclonal antibody anti CA 15-3 conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/5502-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody anti CA 15-3 adsorbed on microplate

REF DCE002/5503-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

8. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M, pH 7.4

REF DCE054-0

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 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it

immediately after use; once opened, the microplate 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.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. 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.
- This method allows the determination of CA 15-3 from 0.5 to 240.0 U/mL.

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.
- 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 the 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 have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	0	15	30	60	120	240

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C

CA 15-3 Calibrators and Control have already been pre-diluted and are ready for use.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.3. Preparation of the Sample

The specimens can be human serum or plasma and 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 venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Specimen can be stored at 2-8°C for at short time (max five days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C (max 30 days). Avoid repeated freezing and thawing.

All the samples must be diluted 1:50 with the Serum diluent, as in the following example:

Serum	20 µL
Serum Diluent	980 µL

Mix gently.

The Control is ready to use.

NB: for samples with concentration over 240 U/mL, dilute further the sample with the Sample diluent (attention: consider this dilution in the calculation of final result).

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	Samples/ Control	Blank
Control / Diluted samples		200 µL	
Calibrator C ₀ -C ₅	200 µL		
Incubate for 1 hour at 37°C without covering the plate. Remove the content from each well. Wash the wells 5 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.			
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate for 1 hour at 37°C without covering the plate. Remove the content from each well. Wash the wells 5 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.			
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 gently the microplate. 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 CA 15-3 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. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. 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. (E_s: 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

	CA 15-3
Non-pregnant healthy women	< 35 U/mL

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 (15x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.5\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements (10x) of five different control sera in different lots of kit. The between assay variability is $\leq 11.4\%$.

10.2. Accuracy

The recovery on three serum samples spiked with 25 - 50 - 100 U/mL of antigen gave an average value ($\pm$ SD) of $106.61\% \pm 8.86\%$.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 - 16 times gave an average value ($\pm$ SD) of $103.71\% \pm 8.56\%$.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA 15-3 that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.40 U/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody are shown in the table:

Antigens	Concentration	% Cross-reactivity
CA 15-3	---	100.0%
CA 125	1,000 U/mL	N.D.
CA 19-9	1,000 U/mL	N.D.
PSA	1,000 ng/mL	N.D.
PAP	1,000 ng/mL	N.D.
AFP	10,000 ng/mL	N.D.
CEA	1,000 ng/mL	N.D.

10.5. Correlation

Diametra CA 15-3 ELISA kit was compared with a commercial reference method. 54 serum samples were analysed according in both test system. The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.86x + 2.66$$

$$r^2 = 0.838$$

$$y = \text{CA 15-3 Diametra}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- 1) Aziz DC, et al Specialty Laboratories, (1991)
- 2) Aziz DC. A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
- 3) Aziz DC, et al J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
- 4) Clark GM, et al N Engl J Med 320:627-33 (1989)
- 5) Elledge RM, et al Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
- 6) Foekens JA, et al Cancer Res 50:3832-7 (1990)
- 7) Isola J, et al J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
- 8) Kute TE, et al Cancer Res 52:198-203 (1992)
- 9) McGuire WL, et al J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
- 10) Nicholson S, et al Br J Cancer 63:146-50 (1991)
- 11) Somerville JE, et al J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
- 12) Ueronese S, et al Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
- 13) Lotnick M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed. 01/2016

DCM055-11

DiaMetra S.r.l. Headquater: 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



DCM055-11
Ed. 01/2016

CA 15-3 ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de CA 15-3 en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO055

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de CA 15-3 en suero o plasma humano.

El kit CA 15-3 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

CA-15-3 es la abreviatura de antígeno tumoral 15-3. Los niveles de CA 15-3 son muy útiles para seguir el curso del tratamiento en mujeres a las que se les ha diagnosticado un cáncer de mama, especialmente en caso de estados avanzados. Los niveles de CA 15-3 son raramente elevados en mujeres con cáncer de mama en fase inicial. El cáncer de ovario, de pulmón y de próstata también puede causar el aumento de los niveles de CA 15-3. Los niveles elevados de CA 15-3 pueden asociarse a patologías benignas, como tumor benigno de mama o enfermedades ováricas, endometriosis, inflamaciones pélvicas y hepatitis.

El embarazo y la lactancia también pueden llevar a un aumento de los niveles de CA 15-3.

Un incremento del 25% del CA 15-3 sérico se asocia a la progresión del carcinoma. Una disminución del 50% del CA 15-3 sérico se asocia a la respuesta al tratamiento. El CA 15-3 es más sensible que el CEA en el diagnóstico de las recaídas del tumor de mama. En combinación con el CA 125, resulta útil en el diagnóstico precoz del tumor de ovario. Los niveles de CA 15-3 aumentan en los tumores de colon, pulmones y hepáticos.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo CA 15-3 ELISA se basa en la captura simultánea del CA 15-3 humano por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa (HRP). Tras un determinado período de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, la enzima presente en la fracción unida, que reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB, desarrolla una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de CA 15-3 presente en la muestra. La concentración de CA 15-3 en la muestra se calcula tomando como base una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 2 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/5506-0
CAL1	REF DCE002/5507-0
CAL2	REF DCE002/5508-0
CAL3	REF DCE002/5509-0
CAL4	REF DCE002/5510-0
CAL5	REF DCE002/5511-0

2. Control (1 frasco, 2 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/5503-0

3. Diluyente de suero (1 frasco, 100 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE018/5518-0

4. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

Anticuerpo monoclonal anti CA 15-3 conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/5502-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo monoclonal anti CA 15-3 absorbido en la microplaca

REF DCE002/5503-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

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

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

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

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 5 (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.
- 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.
- Este método permite la determinación de CA 15-3 de 0,5 a 240,0 U/mL.

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 marcados. 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 el equipo ha sido debidamente validado.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- 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 plato.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato 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 tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U/mL	0	15	30	60	120	240

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables durante 6 meses a 2-8 °C.

No diluir Calibradores y Control; ya se han prediluido y son listo para usar.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

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.

Todas las muestras deben diluirse 1:50 con el diluyente de suero, de la siguiente manera:

Suero	20 µL
Diluyente de suero	980 µL

Mezclar con cuidado.

El Control está listo para usar.

Nota: para las muestras con concentraciones superiores a 240 U/mL diluir más la muestra con Diluyente de Muestra (atención: tener en cuenta esta dilución en el cálculo del resultado final).

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	Muestras /Control	Blanco
Muestras diluidas/ Control		200 µL	
Calibrador C ₀ -C ₅	200 µL		
Incubar a 37°C durante 1 hora sin cubrir la placa. Retirar el contenido de cada pocillo. Lavar cada pocillo 5 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.			

Conjugado	200 µL	200 µL	
Incubar a 37°C durante 1 hora sin cubrir la placa. Retirar el contenido de cada pocillo. Lavar los pocillos 5 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.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), en la oscuridad.			
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 CA 15-3 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. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. 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. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C₀-C₅) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (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

	CA 15-3
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.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (15x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 7,5\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de cinco sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 11,4\%$.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en tres muestras enriquecidas con 25 - 50 - 100 U/mL de antígeno ha dado un valor medio ($\pm$ SD) de 106,61% $\pm$ 8,86%.

La prueba de dilución conductada en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces dio una media ($\pm$ DE) de 103,71% $\pm$ 8,56%

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de CA 15-3 medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,40 U/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas:

Antígeno	Concentración	% Reactividad cruzada
CA 15-3	---	100,0%
CA125	1000 U/mL	N.D.
CA19-9	1000 U/mL	N.D.
PSA	1000 ng/mL	N.D.
PAP	1000 ng/mL	N.D.
AFP	10000 ng/mL	N.D.
CEA	1000 ng/mL	N.D.

10.5. Correlación

El kit CA 15-3 Diametra se ha comparado con un método de referencia disponible en el mercado. Se han comprobado 54 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$y = 0,86 x + 2,66$$

$$r^2 = 0,838$$

$$y = \text{CA 15-3 Diametra}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aziz DC, et al Specialty Laboratories, (1991)
- 2) Aziz DC. A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
- 3) Aziz DC, et al J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
- 4) Clark GM, et al N Engl J Med 320:627-33 (1989)
- 5) Elledge RM, et al Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
- 6) Foekens JA, et al Cancer Res 50:3832-7 (1990)
- 7) Isola J, et al J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
- 8) Kute TE, et al Cancer Res 52:198-203 (1992)
- 9) McGuire WL, et al J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
- 10) Nicholson S, et al Br J Cancer 63:146-50 (1991)
- 11) Somerville JE, et al J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
- 12) Ueronese S, et al Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
- 13) Lotnick M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed. 01/2016

DCM055-11

DiaMetra S.r.l. Headquater: 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