DiaMetra

CE

CA 15-3

per analisi di routine

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

IVD | LOT Vedi etichetta esterna | 2°C 8°C | Σ = 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 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 CA15-3 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 CA15-3; 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 CA 15-3 ELISA TEST è basato sulla cattura simultanea del CA 15-3 umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, 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.
L'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), 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 standard.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. CA 15-3 Standard (6 flaconi, 2 mL ciascuno)

STD0	REF **DCE002/5506-0**
STD1	REF **DCE002/5507-0**
STD2	REF **DCE002/5508-0**
STD3	REF **DCE002/5509-0**
STD4	REF **DCE002/5510-0**
STD5	REF **DCE002/5511-0**

2. CA 15-3 Control (1 flacone, 2 mL)
La concentrazione del Controllo è Lotto-specifica ed è indicata sul Foglio di Controllo 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 CA15-3 coniugato a perossidasi di rafano (HRP) REF **DCE002/5502-0**

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Anticorpo monoclonale anti CA15-3 adsorbito nella micropiastra 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. 20X Conc. Wash Solution (1 flacone, 30 mL)
NaCl 9 g/L; Tween-20 22 g/L REF **DCE007-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 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.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- 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/H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo permette la determinazione del CA15-3 da 0,5 a 240,0 U/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate.
- 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 degli Standards (S_0….S_5)

Gli Standards hanno le seguenti concentrazioni:

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
U/mL	0	15	30	60	120	240

Una volta aperti, gli standard sono stabili sei mesi a 2-8°C.
Non diluire gli standards 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 soluzione di lavaggio tamponata concentrata (20X) con acqua distillata fino al volume di 600 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:20. 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 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.

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

E' importante che tutti i reagenti siano portati a temperatura ambiente (22÷28°C) prima dell' uso. Poiché è necessario operare in doppio, allestire due pozzetti per ogni punto della curva Standard (S_0-S_5), due per ogni Campione, due per il Controllo e uno per il bianco.

Reagente	Standard	Campioni /Controllo	Bianco
Campioni diluiti/ Controllo		**200 µL**	
Standards S_0-S_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.			
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.			
TMB Substrate	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubare a temperatura ambente (22÷28°C) per 15 minuti al riparo dalla luce.			
Stop Solution	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agitare delicatamente la micropiastra. Determinare l'assorbanza (E) a 450 nm contro il bianco.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CA15-3 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 standard 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.

7.1. Interpretazione dei risultati

Se per calcolare i risultati è stato usato il computer, è imperativo che i valori dei calibratori cadano entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

8. RISULTATI

8.1. Note

La OD del calibratore 5 deve essere ≥ 0,9.

8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva standard (S_0 – S_5) e di ogni campione.

8.3. Curva Standard

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno standard (S_0 – S_5) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti standard (es: Four Parameter Logistic).

8.4. 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

Donne sane non in gravidanza: < 35 U/mL

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 ≤ 7,8%.

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 ≤ 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 (± SD) di 106,61% ± 8,86%.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 -8 - 16 volte ha dato un valore medio (± SD) di 103,71% ± 8.56%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di CA 15-3 misurabile che può essere distinta dallo Standard 0 è 0,5 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 (Diametra) è stato comparato con un un metodo di riferimento disponibile in commercio. Sono stati testati 54 campioni di siero. La curva di regressione è:

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

$r^2 = 0,838$

y = CA 15-3 Diametra

x = 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) Lotnicker M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed 07/2011 **DCM055-8**

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039–02–2133354.
Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742–24851 Fax 0039–0742–316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra

CE

CA15-3

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of (CA15-3) 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 CA15-3 concentration in human serum or plasma.
CA15-3 is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

CA-15-3, is an abbreviation for cancer antige 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.
CA15-3 is most useful for monitoring patients post-operatively for recurrence, particularly metastatic diseases. 96% of patients with local and systemic recurrence have elevated CA15-3, which can be used to predict recurrence earlier than radiological and clinical criteria. A 25% increase in the serum CA15-3 is associated with progression of carcinoma. A 50% decrease in serum CA15-3 is associated with response to treatment. CA15-3 is more sensitive than CEA in early detection of breast cancer recurrence. In combination with CA-125, CA15-3 has been shown to be useful in early detection of relapse of ovarian cancer. CA15-3 levels are also increased in colon, lung and hepatic tumours.

2. PRINCIPLE

CA15-3 IEMA test is based on simultaneous binding of human CA15-3 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.
The enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.
The colour intensity is proportional to CA15-3 concentration in the sample.
CA15-3 concentration in the sample is calculated using a standard curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. CA 15-3 Standards (6 vials, 2 mL each)
   - STD0 — REF DCE002/5506-0
   - STD1 — REF DCE002/5507-0
   - STD2 — REF DCE002/5508-0
   - STD3 — REF DCE002/5509-0
   - STD4 — REF DCE002/5510-0
   - STD5 — REF DCE002/5511-0
2. CA 15-3 Control (1 vial, 2 mL)
   Concentration of Control is Lot-specific and is indicated on Quality Control Report
   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 CA15-3 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/5502-0
5. Coated Microplate (1 breakable microplate)
   Monoclonal antibody anti-CA15-3 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. 20X Conc. Wash Solution (1 vial, 30 mL)
   NaCl 9 g/L; Tween-20 22 g/L REF DCE007-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.
Microplates reader (450 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.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- 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/H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants.
- This method allows the determination of CA15-3 from 0.5 to 240.0 U/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly 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 dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment is your 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 should not be used in the assay. Highly lipemeic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Standards (S_0….S_5)

The Standards have the following concentrations:

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
U/mL	0	15	30	60	120	240

Once opened, the Standards are stable six months at 2-8°C
CA15-3 Standards 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 buffered wash solution concentrate (20X) with distilled water to a final volume of 600 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:20 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 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.

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

It's important allow all reagents to reach Room Temperature (22÷28°C) before use.
As it is necessary to perform the determination in duplicate, prepare two wells for each of the six points of the standard curve (S_0-S_5), two for each sample, two for Control and one for Blank.

Reagent	Standard	Samples/ Control	Blank
Diluted samples /Control		**200 µL**	
Standards S_0-S_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.			
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.			
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 Blank.			

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 standard 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.

7.1. Interpretation of results

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

8. RESULTS

8.1. Note

The absorbance (OD) of calibrator 5 should be > 0.9.

8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the standard curve and of each sample.

8.3. Standard Curve

Plot the mean value of absorbance of the standards (Em) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (Es: Four Parameter Logistic).

8.4. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

Healthy women are expected to have CA15-3 values below 35 U/mL.

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 ≤ 7.8%.

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 ≤11.4%.

10.2. Accuracy

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

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

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA 15-3 that can be distinguished from the zero standard is 0.5 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

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

$y = 0.86 x + 2.66$

$r^2 = 0.838$

y = CA 15-3 Diametra

x = 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) Lotnicker M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed 07/2011 **DCM055-8**

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039–02–2133354.
Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742–24851 Fax 0039–0742–316197
E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	**PACKAGING INFORMATION SHEET**	

IT *Spiegazione dei simboli* **GB** *Explanation of symbols* **FR** *Explication des symboles* **ES** *Significado de los simbolos*

DE *Verwendete Symbole* **PT** *Explicaçao dos simbolos*

IVD	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer ES Nûmero de catálogo FR Référéncès du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Establa hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso	LOT	DE Chargenbezeichnung ES Codigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
Σ = xx	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes	**Cont.**	DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitaciôn de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

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% intra-assay 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% inter-assay 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