



DCM056-9
Ed. 01/2015

CA19-9 ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del CA19-9 in siero o in plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO056

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del CA19-9 in siero o plasma umano.

Il kit CA19-9 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il CA19-9 è il principale marker tumorale del gruppo delle glicoproteine "tipo mucine" le quali sono state associate a patologie tumorali gastrointestinali.

La distribuzione immunohistologica del CA19-9 nei tessuti è consistente con la determinazione quantitativa delle maggiori concentrazioni di CA19-9 nei tumori rispetto a tessuti normali e infiammati.

Recenti lavori indicano che CA19-9 frequentemente mostra valori elevati in sieri di soggetti con malattie maligne gastrointestinali, come malattie pancreatiche, colon-rettali, gastriche e carcinomi epatici. Insieme con il CEA, valori elevati si hanno in neoplasie della cistifellea. Persistenti valori elevati del CA19-9 durante i trattamenti terapeutici, possono essere indicativi di metastasi occulte o di malattie residue. Questo antigene associato ai tumori può essere elevato in alcune condizioni non tumorali.

Diversi studi mostrano che i livelli sierici di CA19-9 possono essere utili nel monitorare soggetti affetti dalle patologie sopra menzionate.

Un incremento del CA19-9 è associato ad un progressivo sviluppo del tumore ed ad una scarsa risposta terapeutica. Un decremento del CA19-9 è indicativo di una prognosi favorevole e una buona risposta al trattamento. Valori elevati si hanno comunque in altre malattie non tumorali.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il CA19-9 ELISA test è basato sulla cattura del CA19-9 umano da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastre, l'altro coniugato con la perossidasi (HRP).

Dopo l'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 CA19-9 presente nel campione.

La concentrazione del CA19-9 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)

CAL0	(3 mL)	REF	DCE002/5606-0
CAL1	(1 mL)	REF	DCE002/5607-0
CAL2	(1 mL)	REF	DCE002/5608-0
CAL3	(1 mL)	REF	DCE002/5609-0
CAL4	(1 mL)	REF	DCE002/5610-0
CAL5	(1 mL)	REF	DCE002/5611-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è riportata sul Certificato di Analisi **REF DCE045/5603-0**

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo anti CA19-9 coniugato a perossidasi di rafano (HRP) **REF DCE002/5602-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Anticorpo anti CA19-9 adsorbito su micropiastre **REF DCE002/5603-0**

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE004-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE005-0**

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

0.2M Phosphate buffer, pH 7,4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare i reattivi a 20±8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del reattivo 4 (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.

Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

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 CA19-9 da 0,2 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 migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- 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 pronti all'uso ed 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, sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto del flacone della "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 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.

I campioni con concentrazioni superiori a 240 U/mL possono essere diluiti con lo Calibratori zero. Il Controllo è pronto all'uso.

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 essiccante 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 /Controllo	Bianco
Campione /Controllo		100 µL	
Calibratore C ₀ -C ₅	100 µL		
<p>Incubare a 37°C per 1 ora. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita.</p> <p>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.</p> <p>Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.</p>			
Conjugate	100 µL	100 µL	
<p>Incubare a 37°C per 1 ora. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita.</p> <p>Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubare 15 minuti a temperatura ambiente 22÷28°C, al riparo dalla luce.</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>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.</p>			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli di CA19-9 compresi nel range di basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta. Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento. 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. Inoltre, 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

	CA19-9
Uomini sani e 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 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 kit è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti campioni sierici. La variabilità intra-assay è: $\leq 3,4\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti campioni sierici in differenti lotti di kit. La variabilità inter-assay è: $\leq 6,6\%$.

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di CA19-9 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,18 U/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Specificità

La specificità del presente kit CA19-9 è stata verificata dosando le seguenti sostanze. I risultati sono mostrati nella tabella seguente:

Antigene	Concentrazione	% Cross-reattività
CA19-9	---	100,0%
CA 15-3	1000 U/mL	3,0%
CA 125	400 U/mL	Not Detect
PSA	100 ng/mL	Not Detect
PAP	1000 ng/mL	Not Detect
AFP	10000 ng/mL	Not Detect
CEA	250 ng/mL	Not Detect

10.4. Diluizione

N° 3 campioni sierici con livelli di CA19-9 maggiori di 100 U/mL, sono stati diluiti serialmente con lo Calibratori zero fino ad una diluizione di 1:8. Il recupero in concentrazione medio è risultato pari al 112% (s.d. = 3.1%).

10.5. Recupero

A n° 3 campioni sierici con bassi livelli di CA19-9, sono stati caricati con concentrazioni di 200, 100, 50, 25 e zero U/mL di CA19-9 e quindi dosati. Il recupero medio del CA19-9 aggiunto è stato pari al 92.4% (s.d. = 8.8%).

10.6. Correlazione

Il kit Diametra CA19-9 ELISA è stato confrontato con il sistema automatico Roche Modular, sono stati dosati 22 campioni sierici ed è stata eseguita la regressione lineare della loro concentrazione con i seguenti risultati:

$$(CA19-9 \text{ Diametra}) = 1.33 (CA19-9 \text{ Roche}) - 18.62$$
$$r^2 = 0.808$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

1. Glenn J., et al J. Clin. Oncol. 6:462-8 (1988)
2. Hayakawa T., et al Cancer 61:1827-31 (1988)
3. Koprowski H., et al Science 212:53-5 (1981)
4. Malesci A., et al Gastroenterology 92:60-7 (1987)
5. Safi F., et al Pancreas 2:398-403 (1987)
6. Steinberg W. Am J. of Gastroenterology 85:350-355 (1990)
7. Steinberg W.M., et al Gastroenterology 90:343-9 (1986)
8. Takasaki H., et al Cancer Res. 48:1435-8 (1988)
9. Tatsuta M., et al Cancer 56:2669-73 (1985)
10. Wang T.H. et al Pancreas 1:219-23 (1986)
11. Strom BL, et al Int. J. Cancer 45:821 (1990)

Ed. 01/2015

DCM056-9

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



DCM056-9
Ed. 01/2015

CA19-9 ELISA

for routine analysis

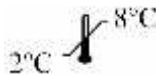
Direct immunoenzymatic determination of CA19-9 in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO056

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CA19-9 concentration in human serum or plasma.

CA19-9 ELISA is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

CA19-9 represents the most important tumour marker of the mucin type glycoproteins group, that are associated to gastrointestinal cancer pathology.

The immunohistologic distribution of CA19-9 in tissues is consistent with the quantitative determination of higher CA19-9 concentrations in cancer than in normal or inflamed tissues. Recent reports indicate that the serum CA19-9 level is frequently elevated in the serum of subjects with various gastrointestinal malignancies, such as pancreatic, colorectal, gastric and hepatic carcinomas. Together with CEA, elevated CA19-9 is suggestive of gall bladder neoplasm in the setting of inflammatory gall bladder disease. This tumour-associated antigen may also be elevated in some non-malignant conditions.

It has been shown that a persistent elevation in serum CA19-9 value following treatment may be indicative of occult metastatic and/or residual disease. Research studies demonstrate that serum CA19-9 values may have utility in monitoring subjects with the above-mentioned diagnosed malignancies.

A persistently rising serum CA19-9 value may be associated with progressive malignant disease and poor therapeutic response. A declining CA19-9 value may be indicative of a favourable prognosis and good response to treatment.

2. PRINCIPLE

CA19-9 ELISA test is based on simultaneous binding of human CA19-9 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 (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is proportional to CA19-9 concentration in the sample. CA19-9 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)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/5606-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/5607-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/5608-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/5609-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/5610-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/5611-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

The concentration of the Control is lot-specific and is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/5603-0

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibody anti CA19-9 conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/5602-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Antibody anti CA19-9 adsorbed on microplate

REF DCE002/5603-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

0.2M Phosphate buffer, 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 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (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. Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilised

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 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.
- This method allows the determination of CA19-9 from 0.2 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. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- 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 ready to use and 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

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of the vial "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 complete dissolution of the crystals; for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL taking care also to transfer the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.3. Preparation of the Sample

The specimens shall 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.

For serum preparation, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; then allow the blood to clot and 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, the samples may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

For sample with concentration over 240 U/mL, dilute the sample with the Calibrator 0.

The Control is ready to use.

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/ Control	Blank
Sample/ Control		100 µL	
Calibrator C ₀ -C ₅	100 µL		
Incubation 1 h at +37°C. Remove the contents 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.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubation 1 h at +37°C. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
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 CA19-9 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 (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) 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

	CA19-9
Healthy people (male and non-pregnant females)	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 (10x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 3.4%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera with different lots of kit. The between assay variability is ≤ 6.6%.

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA19-9 that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.18 U/mL at the 95 % confidence limit.

10.3. Specificity

The cross-reaction of the CA19-9 assay was assessed by measuring apparent dose of various potentially cross-reagents. The results are shown in the following table:

Antigens	Concentration	% Cross-reactivity
CA19-9	---	100.0%
CA 15-3	1,000 U/mL	3.0%
CA 125	400 U/mL	Not Detected
PSA	100 ng/mL	Not Detected
PAP	1,000 ng/mL	Not Detected
AFP	10,000 ng/mL	Not Detected
CEA	250 ng/mL	Not Detected

Ed. 01/2015

DCM056-9

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

10.4. Dilution

Three patient serum samples containing concentrations of CA19-9 up to 100 IU/mL, were serially diluted with Calibrator zero provided in the kit up to a dilution of 8 and assayed.

The percentage of the mean of recovered dose are 112% (s.d. 3.1%).

10.5. Recovery

Three normal serum samples were spiked with 200, 100, 50, 25 and 0 U/mL of CA19-9 and then assayed.

The percentage of the mean of recovered dose is 92.4% (s.d. 8.8%).

10.6. Correlation

CA19-9 ELISA assay was compared to an established method using Roche Modular; 22 serum samples were assayed with both methods.

A linear regression analysis was performed and the following results were obtained:

(CA19-9 Diametra) = 1.33 (CA19-9 Roche) -18.62

$r^2 = 0.808$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Glenn J., et al J. Clin. Oncol. 6:462-8 (1988)
2. Hayakawa T., et al Cancer 61:1827-31 (1988)
3. Koprowski H., et al Science 212:53-5 (1981)
4. Malesci A., et al Gastroenterology 92:60-7 (1987)
5. Safi F, et al Pancreas 2:398-403 (1987)
6. Steinberg W. Am J. of Gastroenterology 85:350-355 (1990)
7. Steinberg W.M., et al Gastroenterology 90:343-9 (1986)
8. Takasaki H., et al Cancer Res. 48:1435-8 (1988)
9. Tatsuta M., et al Cancer 56:2669-73 (1985)
10. Wang T.H. et al Pancreas 1:219-23 (1986)
11. Strom BL, et al Int. J. Cancer 45:821 (1990)



DCM056-9
Ed. 01/2015

CA19-9 ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de CA19-9 en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO056

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de CA19-9 en suero o plasma humano.

El kit CA19-9 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El CA19-9 es el principal marcador tumoral del grupo de las glicoproteínas "tipo mucinas", que se han asociado a patologías tumorales gastrointestinales.

La distribución inmunohistoquímica de CA19-9 en el tejido es consistente con la determinación cuantitativa de las mayores concentraciones de CA19-9 en los tumores en comparación con el tejido normal y se inflama.

Trabajos recientes indican que CA19-9 frecuentemente muestra valores elevados en sueros de individuos con enfermedades malignas gastrointestinales, como enfermedades pancreáticas, colorrectales, gástricas y carcinomas hepáticos.

Junto con CEA, se encuentran valores elevados en neoplasias de la vesícula biliar; algunos estudios han demostrado que este antígeno resulta útil para supervisar esta enfermedad.

Valores elevados persistentes de CA19-9 durante los tratamientos terapéuticos pueden indicar metástasis ocultas o enfermedades residuales.

El incremento de CA19-9 se asocia a un desarrollo progresivo del tumor y a una mala respuesta terapéutica. La reducción de CA19-9 indica un pronóstico favorable y una buena respuesta al tratamiento. Sin embargo, se observan valores elevados en otras enfermedades no tumorales.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo CA19-9 ELISA se basa en la captura del CA19-9 humano por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa (HRP).

Tras los períodos de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por lo 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 CA19-9 presente en la muestra. La concentración de CA19-9 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)

CAL0	(3 mL)	REF DCE002/5606-0
CAL1	(1 mL)	REF DCE002/5607-0
CAL2	(1 mL)	REF DCE002/5608-0
CAL3	(1 mL)	REF DCE002/5609-0
CAL4	(1 mL)	REF DCE002/5610-0
CAL5	(1 mL)	REF DCE002/5611-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/5603-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo anti CA19-9 conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/5602-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti CA19-9 absorbido en la microplaca

REF DCE002/5603-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

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

REF DCE004-0

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

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

REF DCE005-0

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

0.2M Tampón fosfato, 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 20±8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (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.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

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 Proclín 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 CA19-9 de 0,2 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 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 están listos para usarse y 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.

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.

Las muestras con concentraciones superiores a 240 U/mL pueden diluirse con Calibrador cero.

El Control está listo para usar.

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 /Control	Blanco
Muestra /Control		100 µL	
Calibrador C ₀ -C ₅	100 µL		
Incubar a 37°C durante 1 hora. Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL 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.			
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar a 37°C durante 1 hora. Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			

Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
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 suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de CA19-9 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 (E_m) 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 (E_m) 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

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

9. VALORES DE REFERENCIA

	CA19-9
Hombres sanos y 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 (10x) la medición de tres muestras séricas distintas. La variabilidad intraensayo es: $\leq 3,4\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras séricas distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es: $\leq 6,6\%$.

10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de CA19-9 medible que puede distinguirse del Calibrador cero es 0,18 U/mL con un límite de confianza del 95%.

10.3. Especificidad

La especificidad del presente kit CA19-9 se ha comprobado analizando las siguientes sustancias. No se ha detectado ninguna reacción cruzada con las concentraciones indicadas.

Antígeno	Concentración	% Reactividad cruzada
CA19-9	---	100,0%
CA15-3	1000 U/mL	3,0%
CA125	400 U/mL	No detectada
PSA	100 ng/mL	No detectada
PAP	1000 ng/mL	No detectada
AFP	10000 ng/mL	No detectada
CEA	250 ng/mL	No detectada

10.4. Dilución

Tres muestras séricas con niveles de CA19-9 superiores a 100 U/mL se han diluido en serie con Calibrador cero hasta una dilución de 1:8. La recuperación de la concentración media ha resultado igual al 112% (S.D. = 3,1%).

10.5. Recuperación

Se han cargado tres muestras séricas con niveles bajos de CA19-9 con concentraciones de 200; 100;

50; 25 y 0 U/mL de CA19-9 y, a continuación, se han analizado. La recuperación media del CA19-9 añadido ha resultado igual al 92,4% (S.D. = 8,8%).

10.6. Correlación con otros métodos

El método DiaMetra CA19-9 ELISA se ha comparado con el sistema automático Roche Modular; se han analizado una serie de muestras séricas y se ha realizado la regresión lineal de la concentración de estas con los siguientes resultados:

$$(CA19-9 \text{ Diametra}) = 1,33 \cdot (CA19-9 \text{ Roche}) - 18,62$$
$$r^2 = 0,808$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Glenn J., et al J. Clin. Oncol. 6:462-8 (1988)
2. Hayakawa T., et al Cancer 61:1827-31 (1988)
3. Koprowski H., et al Science 212:53-5 (1981)
4. Malesci A., et al Gastroenterology 92:60-7 (1987)
5. Safi F, et al Pancreas 2:398-403 (1987)
6. Steinberg W. Am J. of Gastroenterology 85:350-355 (1990)
7. Steinberg W.M., et al Gastroenterology 90:343-9 (1986)
8. Takasaki H., et al Cancer Res. 48:1435-8 (1988)
9. Tatsuta M., et al Cancer 56:2669-73 (1985)
10. Wang T.H. et al Pancreas 1:219-23 (1986)
11. Strom BL, et al Int. J. Cancer 45:821 (1990)

Ed. 01/2015

DCM056-9

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	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 Establa 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	LOT	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	CONT	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 Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	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			

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

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