



CA 125-IRMA

KIP0301

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo

CE

en

Read entire protocol before use.

CA 125-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative determination of the cancer associated antigen CA 125 in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource CA 125-IRMA Kit
- B. Catalog number : KIP0301 : 96 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

CA 125 is a high molecular weight mucin type glycoprotein, originally defined by the Oc 125 monoclonal antibody (Mab) established by Bast et al. Different epitopes, co-expressed with the Oc 125 epitope on the CA 125 antigen, have been used for the development of heterologous assays for determination of the CA 125 antigen.

B. Clinical applications

Approximately 90% of ovarian cancers are celomic epithelial carcinomas and contain a celomic epithelium-related glycoprotein designated CA 125. CA 125 can be localized in most serous, endometrioid, and clear cell ovarian carcinomas; mucinous tumors express this antigen less frequently. CA 125 is also found in the epithelium of the fallopian tubes, endometrium, and uterine cervix.

Elevated CA 125 levels can result from abdominal diseases other than ovarian cancer. Although CA 125 is most consistently elevated in patients with epithelial ovarian cancer, it can be expressed in a number of gynaecologic (eg, endometrium, fallopian tube) and non-gynaecologic (eg, pancreas, breast, colon, lung) cancers. CA 125 levels are frequently elevated with tumor spread beyond the uterus.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource CA 125-IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mab1, the capture antibody, is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Add calibrators or samples to the tubes. After incubation, washing removes the occasional excess of antigen. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
Tubes coated with anti CA 125(monoclonal antibody).	2 x 48	orange	Ready for use
Ab ^{125}I	1 vial 10,5 ml 760 kBq	red	Ready for use
Anti-CA 125- ^{125}I (monoclonal antibody) in phosphate buffer with bovine serum albumin, azide (<0.1%), bovine serum and inert red dye.			
CAL 0	1 vial lyophilised	yellow	Add 3.0 ml distilled water
Calibrators 0 in bovine serum with thymol .			
CAL N	5 vials lyophilised	yellow	Add 1.0 ml distilled water
Calibrators 1-5 in bovine serum with thymol. See exact value on vial labels.			
INC BUF	2 vials 3 ml	black	Ready for use
Incubation buffer: Tris Maleate buffer with bovine serum albumin, bovine serum and azide.			
WASH SOLN CONC	2 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
Wash solution (TRIS-HCl).			
CONTROL N	2 vials lyophilised	silver	Add 1.0 ml distilled water
Controls - N = 1 or 2 in human plasma and thymol.			

Note: use the zero calibrator for sera dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μl , 100 μl , 1 ml and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Pipette for delivery of 1 to 5 ml of distilled water
4. Vortex mixer
5. Magnetic stirrer
6. Tube shaker (400rpm)
7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators:** Reconstitute the calibrator 0 with 3 ml distilled water and the calibrators 1-5 with 1.0 ml.
- B. **Controls:** Reconstitute the controls with 1.0 ml distilled water.

C. **Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure.

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 100 μl of each into the respective tubes.
3. Dispense 50 μl Incubation buffer in each tube except those for total counts.
4. Incubate for 120 minutes at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
5. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
6. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
7. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Dispense 100 μl of ^{125}I odine labelled anti CA 125 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
10. Incubate for 60 minutes at room temperature on a tube shaker(400 rpm).
11. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
12. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
13. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
14. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
15. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of CA 125 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.

4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

CA 125-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		299443	100
Calibrator	0.0 U/ml	349	0.12
	6.4 U/ml	1261	0.42
	16.2 U/ml	3752	1.25
	49.0 U/ml	12488	4.17
	157.0 U/ml	39441	13.17
	568.0 U/ml	124992	41.74

Since no international reference material is available for CA 125 antigen, DIAsource CA 125-IRMA calibrator values are assigned against a set of in-house reference standards.

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 0.7 U/ml.

B. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (U/ml)}$	CV (%)	Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (U/ml)}$	CV (%)
A	20	31.5 ± 1.2	3.9	A	20	38.0 ± 2.0	5.3
B	20	120.8 ± 2.8	2.3	B	20	114.5 ± 5.7	5.0

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

C. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (U/ml)	Measured Concent. (U/ml)
A	1/1	-	618.8
	1/2	309.4	310.7
	1/4	154.7	161.4
	1/8	77.4	80.9
	1/16	38.7	43.2
	1/32	19.3	21.6
	1/64	9.7	10.3

Samples were diluted with calibrator 0.

RECOVERY TEST

Added CA 125 (U/ml)	Recovered CA 125 (U/ml)	Recovery (%)
31.1	35.5	114 %
65.8	67.7	103 %
124.3	135.7	109 %
257.9	268.9	104 %
531.8	552.4	104 %

D. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	35.9	37.2	39.3	38.5
S 2 (U/ml)	104.5	113.5	117.7	116.6

E. Hook-effect

Samples containing 340.000 U/ml CA 125 give a result higher than the last calibration point.

F. Specificity

The DIAsource CA 125 IRMA is based on two mouse monoclonal antibodies, OvK95 and Ov185, directed against two independent epitopes of the protein core of the CA 125 antigen.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XVI. REFERENCE INTERVALS

Among 154 apparently healthy individuals, 98% of the results were below 35.0 U/ml.

For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history and other findings.

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where bovine spongiform encephalopathy has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious. Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up. Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J..
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.
3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.
CA 125 : The past and the future.
Int J Biol Markers 1998;13:179-187.
4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.
Tumor markers in gynecological cancers : EGTM recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2807-2810.
5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER :
NIH CONSENSUS CONFERENCE.
Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.
JAMA 1995;273:491-497.
6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.
How CA 125 is used in routine clinical practice.
Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.
7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.
Circulating tumor markers in ovarian tumors.
Forum (Genova) 2000;10:383-392.
8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.
Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.
Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Calibrators (0 to 5)	-	100	-
Sample(s), controls	-	-	100
Incubation buffer	-	50	50
Incubation	120 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant)	
Working Wash solution		2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Working Wash solution		2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Tracer	100	100	100
Incubation	60 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant)	
Working Wash solution		2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Working Wash solution		2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

CA 125-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'antigène CA-125 associé au cancer dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit : DIAsource CA 125-IRMA kit
- B. Numéro de catalogue : KIP0301 : 96 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A Activités biologiques

Le CA 125 est une mucine de type glycoprotéique de haut poids moléculaire, définie au départ par l'anticorps monoclonal Oc 125 (AcM) créé par Bast et al. Différents épitopes, co-exprimés avec l'épitope Oc 125 sur l'antigène CA 125, ont été utilisés pour le développement d'analyses hétérogènes destinées à la détermination de l'antigène CA 125.

B. Application clinique

Approximativement 90% des cancers de l'ovaire sont des carcinomes épithéliaux cœlomiques et contiennent une glycoprotéine liée à l'épithélium cœlomique appelée le CA 125. Le CA 125 peut être retrouvé dans la majeure partie des carcinomes ovariens sérieux, endométrioïdes et les adénocarcinomes à cellules claires ; les tumeurs mucineuses expriment moins fréquemment cet antigène. Le CA 125 se trouve également dans l'épithélium des trompes de Fallope, l'endomètre et le col de l'utérus.

Des taux élevés de CA 125 peuvent résulter de maladies abdominales autres que le cancer ovarien. Bien que le CA 125 soit plus constamment élevé chez les patients avec un cancer ovarien épithelial, il peut être exprimé dans un certain nombre de cancers gynécologiques (par ex. endomètre, trompe de Fallope) et non gynécologiques (par ex. pancréas, sein, colon, poumon). Les taux de CA 125 sont fréquemment élevés dans les tumeurs s'étendant au-delà de l'utérus.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource CA 125-Irma est une trousse de dosage radioimmunométrique en deux étapes basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Les AcM1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube en plastique. Ajouter les calibrateurs ou les échantillons aux tubes. Après incubation, laver l'excès occasionnel d'antigène. L'addition de AcM2, l'anticorps signal marqué avec $\text{l}'^{125}\text{I}$, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 96 analyses	Code Couleur	Reconstitution
Tubes recouverts avec l'anti CA 125 (anticorps monoclonal)	2 x 48	Orange	Prêt à l'emploi
Ab ^{125}I TRACEUR: CA 125 marquée à $\text{l}'^{125}\text{Iodine}$ (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, du sérum bovin, de l'azoture de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	1 flacon 10,5 ml 760 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
CAL 0 Calibrateur zéro dans du sérum bovin et du thymol	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 3,0 ml d'eau distillée
CAL N Calibrateur N = 1 à 5 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum bovin et du thymol	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1,0 ml d'eau distillée
INC BUF Tampon d'incubation : tampon Tris maléate contenant du sérum bovin, du sérum bovin et de l'azoture (<0,1%)	2 flacons 3 ml	Noir	Prêt à l'emploi
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)	2 flacons 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 1,0 ml d'eau distillée

Note: Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 50 μl , 100 μl , 1 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
3. Pipette pour distribuer de 1 à 5 ml d'eau distillée
4. Agitateur vortex
5. Agitateur magnétique
6. Agitateur de tubes (400rpm)
7. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
8. Système d'aspiration (optionnel)
9. Tout compteur gamma capable de mesurer $\text{l}'^{125}\text{I}$ peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 3,0 ml d'eau distillée et les calibrateurs 1 à 5 avec 1,0 ml.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 1,0 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage

(70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables. Utiliser les immédiatement après leur reconstitution. Congeler immédiatement en aliquotes et conserver les à -20°C pendant trois mois au maximum. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 100 μl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Ajouter 50 μl de tampon d'incubation dans chaque tube à l'exception des ceux servant au comptage total.
4. Incuber pendant 120 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
5. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
6. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
7. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
8. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
9. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
10. Distribuer 100 μl de traceur dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
11. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
12. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
13. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
14. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes

utilisés pour la détermination de l'activité totale).

15. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
16. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
17. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en CA 125 (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

CA 125-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		299443	100
Calibrateur	0,0 U/ml 6,4 U/ml 16,2 U/ml 49,0 U/ml 157,0 U/ml 568,0 U/ml	349 1261 3752 12488 39441 124992	0,12 0,42 1,25 4,17 13,17 41,74

Comme on ne dispose pas de matériel international de référence pour l'antigène CA 125, les valeurs du calibrateur DIAsource CA 125-IRMA sont attribuées à un jeu de standards de référence internes.

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,7 U/ml.

B. Précision

INTRA-ESSAI			INTER-ESSAI				
Sérum	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (U/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (U/ml)	CV (%)
A	20	$31,5 \pm 1,2$	3,9	A	20	$38,0 \pm 2,0$	5,3
B	20	$120,8 \pm 2,8$	2,3	B	20	$114,5 \pm 5,7$	5,0

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

C. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

CA 125 ajoutée (U/ml)	CA 125 récupérée (U/ml)	Récupération (%)
31,1	35,5	114 %
65,8	67,7	103 %
124,2	135,7	109 %
257,9	268,9	104 %
531,8	552,4	104 %

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (U/ml)	Concent. Mesurée (U/ml)
A	1/1	-	618,8
	1/2	309,4	310,7
	1/4	154,7	161,4
	1/8	77,4	80,9
	1/16	38,7	43,2
	1/32	19,3	21,6
	1/64	9,7	10,3

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

D. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	35,9	37,2	39,3	38,5
S 2 (U/ml)	104,5	113,5	117,7	116,6

E. Effet crochet

Les échantillons contenant 340.000 U/ml de CA 125 donnent un résultat supérieur au dernier point de calibration.

F. Spécificité

Le DIAsource CA 125 IRMA est basé sur deux anticorps monoclonaux de souris, OvK95 et Ov185, dirigés contre deux épitopes indépendants du noyau protéinique de l'antigène CA 125.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousseaux d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro.
Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés en aliquotes. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation de la différence entre les résultats des échantillons analysés en double doivent être basés sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Parmi 154 individus apparents en bonne santé, 98% des résultats étaient en dessous de 35,0 U/ml.

Pour être utilisés à des fins diagnostiques, les résultats obtenus avec cet essai doivent toujours être utilisés en combinaison avec l'examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres constatations.

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J.
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.
3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.
CA 125 : The past and the future.
Int J Biol Markers 1998;13:179-187.
4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.
Tumor markers in gynaecological cancers : EGTM recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2807-2810.
5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER : NIH CONSENSUS CONFERENCE.
Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.
JAMA 1995;273:491-497.
6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.
How CA 125 is used in routine clinical practice.
Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.
7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.
Circulating tumor markers in ovarian tumors.
Forum (Genova) 2000;10:383-392.

8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.

Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.

Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (μl)	CALIBRATEURS (μl)	ECHANTILLONS CONTRÔLES (μl)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, Contrôles Tampon d'incubation	- - -	100 - 50	- 100 50
Incubation	120 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 ml aspiration 2,0 ml aspiration	
Traceur	100	100	100
Incubation	60 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 ml aspiration 2,0 ml aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

CE

de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

CA 125-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung des tumorassoziierten Antigens CA 125 in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. Handelsbezeichnung : DIAsource CA 125-IRMA Kit
- B. Katalognummer : KIP0301 : 96 Tests
- C. Hergestellt von: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75
E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A Biologische Aktivitäten

CA 125 ist ein hochmolekulares Glykoprotein vom Typ Muzin, ursprünglich definiert durch den monoklonalen Antikörper Oc 125 (Mab) und nachgewiesen von Bast et al. Verschiedene Epitope, koexprimiert mit dem Oc 125 Epitop auf dem CA 125 Antigen, wurden für die Entwicklung heterologer Assays zur Bestimmung des CA 125 Antigens benutzt.

B. Klinische Anwendung

Annähernd 90% der Krebserkrankungen der Ovarien sind zöliomische, epitheliale Tumore und enthalten ein zöliomisches Epithel-verwandtes Glykoprotein, das als CA 125 bezeichnet wird. CA 125 kann bei den meisten serösen, endometrioiden und Klarzellentumoren der Ovarien gefunden werden; muzinöse Tumore produzieren häufig weniger dieses Antigens. CA 125 findet sich ebenso in dem Epithel der Fallopio-Tube, im Endometrium und im cervix uteri.

Erhöhte CA 125 Werte können ebenso aus Erkrankungen des Abdomens resultieren, denn von Karzinomen der Ovarien. Auch wenn CA 125 meist bei Patienten mit epithelialen Ovarialkarzinomen gleichbleibend erhöht ist, kann es auch bei einer Reihe gynäkologischer (z.B. Endometriose, Fallopio-Tube) und nicht-gynäkologischer (z.B. Pankreas, Brust, Colon, Lunge) Tumorarten entstehen. CA 125 Werte sind häufig bei sich über den Uterus ausbreitenden Tumoren erhöht.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DiaSource CA 125-IRMA ist ein Zwei-Schritt immunradioimetrischer Assay in beschichteten Röhrchen. Mab1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. Hinzugabe der Kalibratoren und Proben in die Röhrchen. Nach der Inkubation durch Waschen gelegentlichen Überschuss an Antigenen entfernen. Zugabe von Mab2, des mit ^{125}I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution
Mit anti CA 125- beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	orange	gebrauchsfertig
TRACER: ^{125}I odmarkierter Anti-CA 125 (monoklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit RinderserumalBUMIN, Rinderserum, Azid (<0,1%) und inertem roten Farbstoff	1 Gefäß 10,5 ml 760 kBq	rot	gebrauchsfertig
Null Kalibrator in Rinderserum und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	gelb	3,0 ml dest. Wasser zugeben
Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Rinderserum und Thymol	5 Gefässe lyophilisiert	gelb	1,0 ml dest. Wasser zugeben
Inkubationspuffer: Tris-maleate Puffer mit RinderserumalBUMIN, Rinderserum und Azid (<0,1%)	2 Gefässe 3 ml	schwarz	gebrauchsfertig
Waschlösung (Tris-HCl)	2 Gefässe 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma und Thymol	2 Gefässe lyophilisiert	silber	1,0 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 50 μl , 100 μl , 1 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Pipette zur Abgabe von 1 bis 5 ml dest. Wasser
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Vortex Mixer
- Schüttler für Röhrchen (400rpm)
- Magnetrührer
- Jegl. Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Nullstandard mit 3,0 ml dest. Wasser und die Kalibratoren 1-5 mit 1,0 ml dest. Wasser.

B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1,0 ml dest. Wasser.

C. **Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Die Kalibratoren und Proben sind sehr instabil. Benutzung sofort nach der Rekonstitution oder sofort in Aliquots bei -20°C für bis zu 3 Monate einfrieren. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 100 μl in ihre Röhrchen.
- Dispensieren sie 50 μl Inkubationspuffer in jedes Röhrchen, außer dem für die gesamtaktivität.
- Inkubieren Sie 120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Geben Sie 100 μl des Tracers in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Inkubieren Sie 60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht

stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
17. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration CA 125 (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

CA 125-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		299443	100
Kalibrator	0,0 U/ml 6,4 U/ml 16,2 U/ml 49,0 U/ml 157,0 U/ml 568,0 U/ml	349 1261 3752 12488 39441 124992	0,12 0,42 1,25 4,17 13,17 41,74

Weil kein internationales Referenzmaterial für das CA 125 Antigen erhältlich ist, werden DIAsource CA 125-IRMA Kalibrationswerte gegen ein Set von in-house Referenzstandards bestimmt.

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,7 U/ml.

B. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (U/ml)	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (U/ml)	CV (%)
A	20	31,5 ± 1,2	3,9	A	20	38,0, ± 2,0	5,3
B	20	120,8 ± 2,8	2,3	B	20	114,5 ± 5,7	5,0

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

C. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (U/ml)	Gemess. Konzent. (U/ml)
A	1/1	-	618,8
	1/2	309,4	310,7
	1/4	154,7	161,4
	1/8	77,4	80,9
	1/16	38,7	43,2
	1/32	19,3	21,6
	1/64	9,7	10,3

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Zugeg. CA 125 (U/ml)	Wiedergef. CA 125 (U/ml)	Wiedergefunden (%)
31,1	35,5	114 %
65,8	67,7	103 %
124,2	135,7	109 %
257,9	268,9	104 %
531,8	552,4	104 %

D. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	35,9	37,2	39,3	38,5
S 2 (U/ml)	104,5	113,5	117,7	116,6

E. Hook-Effekt

Proben, die 340000 U/ml CA 125 enthalten, ergeben ein höheres Resultat als der letzte Kalibrationspunkt.

F. Spezifität

Der DIAsource CA 125 IRMA basiert auf zwei monoklonalen Antikörpern der Maus OvK95 und Ov185, die gegen zwei unabhängige Epitope des Kernproteins des CA 125 Antigens gerichtet sind.

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren. Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden. Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XVI. REFERENZ INTERVALLE

Unter 154 anscheinend gesunden Einzelpersonen, 98% der Resultate waren unter 35,0 U/ml.

Für diagnostische Zwecke sollten die durch diesen Assay erzielten Ergebnisse nur in Verbindung mit klinischen Untersuchungen, der Patientengeschichte und anderen Befunden genutzt werden.

XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussröhren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriften den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVIII. LITERATUR

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J.
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.
3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.
CA 125 : The past and the future.
Int J Biol Markers 1998;13:179-187.
4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.
Tumor markers in gynaecological cancers : EGTG recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2807-2810.
5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER :
NIH CONSENSUS CONFERENCE.
Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.
JAMA 1995;273:491-497.
6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.
How CA 125 is used in routine clinical practice.
Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.
7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.
Circulating tumor markers in ovarian tumors.
Forum (Genova) 2000;10:383-392.
8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.
Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.
Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA-TOREN (µl)	PROBEN, KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	- - -	100 - 50	- 100 50
Inkubation	120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2.0 ml absaugen (oder dekant.) 2.0 ml absaugen (oder dekant.)	
Tracer	100	100	100
Inkubation	60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2.0 ml absaugen (oder dekant.) 2.0 ml absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		



it

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

CA 125-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'antigene CA 125, associato alle neoplasie, nel siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale: DIAsource CA 125-IRMA Kit
B. Numero di catalogo: KIP0301: 96 test
C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

La CA 125 è una glicoproteina simil-mucina a elevato peso molecolare, definita in origine dall'anticorpo monoclonale Oc 125 (Mab) identificato da Bast et al. Diversi epitopi, co-espressi con l'epitopo Oc 125 sull'antigene CA 125, sono stati utilizzati per lo sviluppo di test eterologhi per la determinazione dell'antigene CA 125.

B. Applicazioni cliniche

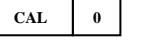
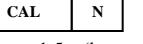
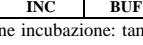
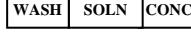
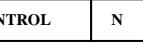
Circa il 90% dei tumori ovarici è rappresentata dai carcinomi dell'epitelio celomatico e contengono una glicoproteina legata all'epitelio celomatico denominata CA 125. La CA 125 è localizzabile nella maggior parte dei carcinomi ovarici della sierosa, dell'endometrio e a cellule chiare; i tumori mucinosi esprimono questo antigene meno frequentemente. La CA 125 è anche riscontrabile nell'epitelio delle tube di Falloppio, dell'endometrio e della cervice uterina.

Livelli elevati di CA 125 possono derivare da patologie addominali diverse dal carcinoma ovarico. Sebbene il livello di CA 125 sia più elevato nei pazienti con carcinoma ovarico epiteliale, è possibile evidenziarlo anche in un certo numero di carcinomi ginecologici (es. endometrio, tuba di Falloppio) e non-ginecologici (es. pancreas, mammella, colon, polmone). I livelli di CA 125 sono frequentemente elevati nei tumori che si diffondono oltre l'utero.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DIAsource CA 125-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico a due fasi con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Aggiungere i calibratori o i campioni alle provette. Dopo incubazione, lavare per rimuovere l'eventuale eccesso di antigene. L'aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con ^{125}I , provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di CA 125 in standard e campioni.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
Provette sensibilizzate con anticorpo anti CA 125 (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Arancione	Pronto per l'uso
 Marcato: anti-CA 125 (Anticorpi monoclonali) marcati con ^{125}I in tampone fosfato con BSA, siero bovino, sodio azide (<0,1%) e un colorante inerte rosso	1 flacone 10,5 ml 760 kBq	Rosso	Pronto per l'uso
 Calibratore zero in siero bovino, contenente timolo	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 3 ml di acqua distillata
 Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero bovino, contenente timolo	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata
 Tampone incubazione: tampone Tris Maleato con BSA, siero bovino e azide (<0,1%)	2 flaconi 3 ml	Nero	Pronto per l'uso
 Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	2 flaconi 10 ml	Bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
 Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano, contenente timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata

Note: Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata.
- Pipette per dispensare 50 μl , 100 μl , 1 ml e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Pipettare per dispensare da 1 a 5 ml di acqua distillata
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Agitatore rotante (400rpm)
- Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 3 ml di acqua distillata e i calibratori 1-5 con 1,0 ml.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 1,0 ml di acqua distillata.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Calibratori e controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 100 μl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- Dispensare 50 μl di tampone di incubazione in ogni provetta ad eccezione di quelle per i conteggi totali.
- Incubare 120 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
- Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Dispensare 100 μl di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
- Incubare 60 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
- Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido

residue.

17. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di CA 125. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
- Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di CA 125 in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

CA 125-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		299443	100
Calibratore	0,0 U/ml 6,4 U/ml 16,2 U/ml 49,0 U/ml 157,0 U/ml 568,0 U/ml	349 1261 3752 12488 39441 124992	0,12 0,42 1,25 4,17 13,17 41,74

Dal momento che non è disponibile materiale di riferimento internazionale per l'antigene CA 125, i valori del calibratore DIAsource CA 125-IRMA sono assegnati rispetto a un set di standard di riferimento in-house.

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,7 U/ml.

B. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (U/ml)}$	CV (%)	Siero	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (U/ml)}$	CV (%)
A	20	$31,5 \pm 1,2$	3,9	A	20	$38,0 \pm 2,0$	5,3
B	20	$120,8 \pm 2,8$	2,3	B	20	$114,5 \pm 5,7$	5,0

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

C. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (U/ml)	Concentrazione misurata (U/ml)
A	1/1	-	618,8
	1/2	309,4	310,7
	1/4	154,7	161,4
	1/8	77,4	80,9
	1/16	38,7	43,2
	1/32	19,3	21,6
	1/64	9,8	10,3

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

CA 125 aggiunta (U/ml)	CA 125 recuperata (U/ml)	Recupero (%)
31,1	35,5	114 %
65,8	67,7	103 %
124,2	135,7	109 %
257,9	268,9	104 %
531,8	552,4	104 %

D. Tempo trascorso tra laggiunta dellultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo laggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	35,9	37,2	39,3	38,5
S 2 (U/ml)	104,5	113,5	117,7	116,6

E. Effetto hook

I campioni contenenti 340.000 U/ml CA 125 danno un risultato maggiore rispetto allultimo punto di calibrazione.

F. Specificità

Il DIAsource CA 125 IRMA si basa su due anticorpi monoclonali di topo, OvK95 e Ov185, diretti contro due epitopi indipendenti del core proteico dellantigene CA 125.

XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sullimpiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. CONTROLLO DI QUALITÀ' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Fra 154 individui apparentemente in buona salute, 98% dei risultati erano inferiori a 35,0 U/ml.

Per fini diagnostici, i risultati di questo dosaggio devono essere sempre utilizzati come complemento ad esami clinici, dati anamnestici e altro.

XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato alluso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per luso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati

da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J..
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.
3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.
CA 125 : The past and the future.
Int J Biol Markers 1998;13:179-187.
4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.
Tumor markers in gynaecological cancers : EGTM recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2807-2810.
5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER :
NIH CONSENSUS CONFERENCE.
Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.
JAMA 1995;273:491-497.
6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.
How CA 125 is used in routine clinical practice.
Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.
7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.
Circulating tumor markers in ovarian tumors.
Forum (Genova) 2000;10:383-392.
8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.
Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.
Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale µl	Calibratore µl	CAMPIONI Controlli µl
Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Tampone incubazione	- - -	100 - 50	- 100 50
Incubazione	120 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione		Aspirare 2 ml Aspirare 2 ml Aspirare	
Marcato	100	100	10
Incubazione	60 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione		Aspirare 2 ml Aspirare 2 ml Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

CA 125-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del antígeno CA 125, asociado al cáncer, en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre: DIAsource CA 125-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo: KIP0301 : 96 tests
- C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A Actividades Biológicas

CA 125 es una glucoproteína de tipo mucina de gran peso molecular, definida originalmente por el anticuerpo monoclonal Oc 125 establecido por Bast y col. Se han utilizado distintos epítopes, expresados conjuntamente con el epítope Oc 125 del antígeno CA 125, para el desarrollo de ensayos heterólogos dirigidos a la determinación del antígeno CA 125.

B. Aplicación clínica

Alrededor de un 90% de los cánceres ováricos son carcinomas del epitelio celómico y contienen una glucoproteína relacionada con el epitelio celómico, designada como CA 125. CA 125 se puede localizar en la mayoría de los carcinomas de ovario serosos, endometroides y de células claras; los tumores mucinosos manifiestan este antígeno con menor frecuencia. CA 125 también se encuentra en el epitelio de las trompas de falopio, el endometrio y el cérvix.

Un nivel elevado de CA 125 puede ser indicativo de patologías abdominales ajenas al cáncer ovárico. Aunque el nivel de CA 125 es sistemáticamente más elevado en pacientes con cáncer ovárico epitelial, puede manifestarse en diversos cánceres ginecológicos (p. ej., de endometrio, trompas de falopio) y no ginecológicos (p. ej. páncreas, mama, colon, pulmón). Los niveles de CA 125 suelen ser elevados ante una extensión del tumor más allá del útero.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

CA 125-Irma de DIAsource es un radioinmunoensayo en dos pasos basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte interior inferior de las paredes del tubo de poliestireno. Añade calibradores o muestras a los tubos. Después de la incubación, el lavado elimina el exceso ocasional de antígeno. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ^{125}I , completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti CA 125 (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	naranja	Listo para uso
Ab ^{125}I	1 vial 10,5 ml 760 kBq	rojo	Listo para uso
TRAZADOR: anti-CA 125 (anticuerpos monoclonales) marcado con ^{125}I en tampón fosfato con albúmina bovina, suero bovino, azida (<0,1%) y un colorante rojo inerte			
CAL 0	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 3 ml de agua destilada
Calibrador cero en suero bovino y thymol			
CAL N	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1,0 ml de agua destilada
Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero bovino y thymol			
INC BUF	2 viales 3 ml	Negro	Listo para uso
Tampón de incubación: Tampón tris-maleato con albúmina bovina, suero bovino y azida (<0,1%)			
WASH SOLN CONC	2 viales 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
Solución de lavado (Tris-HCl)			
CONTROL N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 1,0 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y thymol			

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 μl , 100 μl , 1 ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Pipeta para suministrar de 1 a 5 ml de agua destilada
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Agitador de tubos (400rpm)
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir ^{125}I (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3,0 ml de agua destilada y los calibradores 1-5 con 1,0 ml.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 1,0 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1

parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes álfocutas y mantenerse a -20° C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 100 μl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispense 50 μl de tampón de incubación en cada tubo, excepto los de los recuentos totales.
4. Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
5. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
6. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
7. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
8. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
9. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
10. Dispensar 100 μL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
11. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
12. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
13. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
14. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
15. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
16. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
17. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenece el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes contenido substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetejar con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.

Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.

J Clin Invest 1981;68:1331-1337.

2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J..

New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.

Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.

3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.

CA 125 : The past and the future.

Int J Biol Markers 1998;13:179-187.

4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.

Tumor markers in gynecological cancers : EGT recommendations.

Anticancer Res 1999;19:2807-2810.

5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER : NIH CONSENSUS CONFERENCE.

Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.

JAMA 1995;273:491-497.

6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.

How CA 125 is used in routine clinical practice.

Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.

7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.

Circulating tumor markers in ovarian tumors.

Forum (Genova) 2000;10:383-392.

8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.

Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.

Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (μl)	CALIBRADOR ES (μl)	MUESTRAS CONTROL(ES) (μl)
Calibradores (0 al 5) Muestras, controles Tampón de incubación	- - -	100 - 50	- 100 50
Incubación	120 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación Solución de Lavado Separación Solución de Lavado Separación	- - - - -	aspirar 2,0 ml aspirar 2,0 ml aspirar	
Trazador	100	100	100
Incubación	60 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación Solución de Lavado Separación Solución de Lavado Separación	- - - - -	aspirar 2,0 ml aspirar 2,0 ml aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

CA 125-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικής εξέτασης για τον *in vitro* ποσοτικό προσδιορισμό στον ορό του αντιγόνου (CA 125) που σχετίζεται με τον καρκίνο.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Κιτ CA 125-IRMA της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KIP0301: 96 εξετάσεις
- Γ. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογικές δράσεις

Το CA 125 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη τύπου βλεννίνης, υψηλού μοριακού βάρους, η οποία αρχικώς ορίστηκε από το μονοκλωνικό αντίσωμα (Mab) Oc 125 που καθιερώθηκε από τον Bast και άλλους. Διαφορετικοί επίτοποι, οι οποίοι συνεκφράζονται με τον επίτοπο Oc 125 στο αντιγόνο CA 125, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη ετερόλογων προσδιορισμών για εντοπισμό του αντιγόνου CA 125.

B. Κλινική εφαρμογή

Περίπου το 90% των καρκίνων των ωοθηκών είναι καρκινώματα του επιθηλίου του σπλαχνικού κοιλώματος και περιλαμβάνουν μια σχετική με το επιθήλιο του σπλαχνικού κοιλώματος γλυκοπρωτεΐνη που ονομάζεται CA 125. Το CA 125 μπορεί να εντοπιστεί στα περισσότερα ορώδη, ενδομητριοειδή και διαυγών κυττάρων καρκινώματα των ωοθηκών, ενώ αυτό το αντιγόνο εκφράζεται λιγότερο συχνά σε βλεννώδεις όγκους. Το CA 125 βρίσκεται επίσης στο επιθήλιο των σαλπίγγων, στο ενδομήτριο και στον τράχηλο της μήτρας.

Αυξημένα επίπεδα CA 125 ενδέχεται επίσης να είναι το αποτέλεσμα άλλων νόσων εκτός του καρκίνου των ωοθηκών. Παρότι το CA 125 είναι κατά κανόνα αυξημένο σε ασθενείς με καρκίνο του επιθηλίου των ωοθηκών, μπορεί να εκφραστεί σε έναν αριθμό γυναικολογικών (π.χ. του ενδομητρίου, της σάλπιγγας) και μη γυναικολογικών καρκίνων (π.χ. του παγκρέατος, του μαστού, του κόλου, του πνεύμονα). Τα επίπεδα του CA 125 αυξάνονται συχνά με τη διασπορά του όγκου πέρα από τη μήτρα.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η DIAsource CA 125-IRMA είναι μια ανοσοραδιομετρική εξέταση δύο βημάτων που βασίζεται στο διαχωρισμό σε επιστρωμένο σωληνάριο. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Προσθέτετε τον βαθμονομητές ή τα δείγματα στα σωληνάρια. Έπειτα από την επώαση, η πλύση αποβάλλει την πιθανή περίσσεια αντιγόνου. Προσθήκη Mab2, τον αντισώματος σηματοδότησης που είναι σημασμένο με ^{125}I , θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με anti CA 125 (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	πορτοκαλί	Έτοιμο για χρήση
	1 φιαλίδιο 10,5 ml 760 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντi-CA 125 (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ^{125}I ιδοίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκωματίνη, βόειο ορό, αζίδιο (<0,1%) και μια αδρανής κόκκινη χρωστική			
	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 3,0 ml απεσταγμένου νερού
Μηδενικός βαθμονομητής σε βόειο ορό με θυμόλη			
	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1,0 ml απεσταγμένου νερού
Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε βόειο ορό και θυμόλη			
	2 φιαλίδια 3 ml	Μαύρο	Έτοιμο για χρήση
Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-μηλικών με βόεια ορολευκωματίνη, βόειο ορό και αζίδιο (<0,1%)			
	2 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)			
	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 1,0 ml απεσταγμένου νερού
Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη			

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 1 ml και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλόσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πιπέτες για διανομή από 1 έως 5 ml απεσταγμένου νερού
- Αναμείκηση στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (tύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ^{125}I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Πραγματοποιήστε την ανασύσταση του μηδενικού βαθμονομητή με 3 ml απεσταγμένου νερού και των βαθμονομητών 1-5 με 1 ml.
- Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά από την ανασύσταση, ψύξτε αμέσως σε κλάσματα και διατηρείστε σε -20°C για 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμηνευτικό κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20°C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

X. ΛΙΑΛΙΚΑΣΙΑ

- Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλόσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακριβεία βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- Διαδικασία**
 - Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φωτισλογικά σωληνάρια.
 - Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανέμετε 100 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
 - Διανείμετε 50 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ("total").
 - Επωάστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
 - Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 - Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 - Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
 - Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
 - Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.

- Διανείμετε 100 μl ιχνηθέτη σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη 125I ("total").
- Επωάστε επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
- Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
- Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της CA 125 (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγονήγη δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

CA 125-IRMA	cpm	B/T (%)	
Συνολική μέτρηση	299443	100	
Βαθμονομητής	0,0 U/ml 6,4 U/ml 16,2 U/ml 49,0 U/ml 157,0 U/ml 568,0 U/ml	349 1261 3752 12488 39441 124992	0,12 0,42 1,25 4,17 13,17 41,74

Δεδομένου του ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο υλικό διεθνούς αναφοράς για το αντίγρово CA 125, οι τιμές των βαθμονομητών DIAsource CA 125-IRMA προσδιορίζονται έναντι ενός εσωτερικού σε προτύπων αναφοράς.

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,7 U/ml.

B. Ειδικότητα

Ο προσδιορισμός DIAsource CA 125 IRMA βασίζεται σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, το OvK95 και το Ov185, που κατευθύνονται ενάντια σε δύο ανεξάρτητους επιτόπους του πρωτεΐνικού πυρήνα του αντιγόνου CA 125.

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	$\text{\langle X \rangle \pm T.A. (U/ml)}$	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	$\text{\langle X \rangle \pm T.A. (U/ml)}$	Σ.Δ. (%)
A	20	$31,5 \pm 1,2$	3,9	A	20	$38,0 \pm 2,0$	5,3
B	20	$120,8 \pm 2,8$	2,3	B	20	$114,5 \pm 5,7$	5,0

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Προστεθείσα CA 125 (U/ml)	Ανακτηθείσα CA 125 (U/ml)	Ανάκτηση (%)
31,1	35,5	114 %
65,8	67,7	103 %
124,2	135,7	109 %
257,9	268,9	104 %
531,8	552,4	104 %

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (U/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (U/ml)
A	1/1 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64	- 309,4 154,7 77,4 38,7 19,3 9,7	618,8 310,7 161,4 80,9 43,2 21,6 10,3

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Οπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	35,9	37,2	39,3	38,5
S 2 (U/ml)	104,5	113,5	117,7	116,6

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγματα που περιέχουν 340.000 U/ml CA 125 δίνουν ένα αποτέλεσμα υψηλότερο από το τελευταίο σημείο βαθμονόμησης.

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντίποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με κίτ προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτιθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην επικέτα του φιαλίδιου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XVI. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μεταξύ 154 φανερά υγειών ατόμων, 98% των αποτελεσμάτων ήταν κάτω των 35,0 U/ml.

Για διαγνωστικούς σκοπούς, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από αυτόν τον προσδιορισμό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα σε συνδυασμό με την κλινική εξέταση, το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και άλλα ευρήματα.

XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το κιτ αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊστοπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σοληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ίδιατερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συστάρευσης αζίδιου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μην χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην δισενέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J.
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.

3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.

CA 125 : The past and the future.

Int J Biol Markers 1998;13:179-187.

4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.

Tumor markers in gynaecological cancers : EGTG recommendations.

Anticancer Res 1999;19:2807-2810.

5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER : NIH CONSENSUS CONFERENCE.

Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.

JAMA 1995;273:491-497.

6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.

How CA 125 is used in routine clinical practice.

Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.

7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.

Circulating tumor markers in ovarian tumors.

Forum (Genova) 2000;10:383-392.

8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.

Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.

Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μl)	ΒΑΘΟΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) Υλικά ελέγχου (μl)
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, Υλικά ελέγχου Ρυθμιστικό διάλυμα επώσης	- - -	100 - 50
Επώαση	120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm	100
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	- - - - -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)
Ιχνηθέτης	100	100
Επώαση	60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm	100
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	- - - - -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα	

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

CA 125-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro antygenu związanego z nowotworem CA 125 w surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa: DIAsource CA 125-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP0301: 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

CA 125 jest glikoproteiną o wysokiej masie cząsteczkowej z rodzaju mucyn zdefiniowaną jako przeciwciało monoklonalne (Mab) Qc 125 przez Bast i wsp. Do opracowania heterologicznych oznaczeń przeznaczonych do określenia antygenu CA 125 wykorzystywano różne epitopy występujące razem z epitopem Qc 125 na antygenie CA 125.

B. Zastosowanie kliniczne

Około 90% występujących raków jajnika jest rakami pochodzenia mezodermalnego (tkanka nabłonkowa) i zawiera glikoproteiny związane z nabłonkiem pochodzenia mezodermalnego (celoma) oznaczone jako CA 125. CA 125 może występować w większości poważnych raków endometrialnych i jasnoróżowych jajnika. Rzadziej antigen ten jest prezentowany w guzach śluzowych. CA 125 występuje również w nabłonkach jajowodów, endometrium i szyjki macicy.

Podwyższone poziomy CA 125 mogą występować w chorobach brzusnych innych niż rak jajnika. Chociaż CA 125 jest w większości podwyższony u pacjentów z nabłonkowym rakiem jajnika, może występować również w wielu nowotworach ginekologicznych (np.: w raku endometrium, jajowodu) i nieginekologicznych (np.: w rakach trzustki, sutka, okrężnicy i płuc). Poziomy CA 125 są często podwyższone w stanach rozsiewu nowotworu poza macicę.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Test DIAsource CA 125-IRMA jest dwuetapowym oznaczeniem radioimmunologicznym opartym na separacji w opłaszczonej probówkach. Mab1, pochwycone przeciwciała, są unieruchomione na dolnej wewnętrznej powierzchni plastikowej probówki. Należy dodać kalibratory lub próbki do probówek. Po inkubacji w procesie płukania zostanie usunięty nadmiar antygenu. Dodanie Mab2, przeciwciała sygnałowego oznakowanego ^{125}I zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przepłukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Ilość 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone przeciwciążami anty-CA 125 (przeciwiąża monoklonalne)	2 x 48	pomarańczowy	Gotowe do zastosowania.
Ab ^{125}I	1 fiołka 10,5 ml 760 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania.
Przeciwiąża monoklonalne anty-CA 125- ^{125}I) w buforze fosforanowym z albuminą z surowicy bydlęcej, azydkiem (<0,1%), surowicą bydlęcą i czerwonym barwnikiem obojętnym.	1 fiołka 10,5 ml 760 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania.
CAL 0	1 fiołka liofil.	żółty	Dodać 3 ml wody destylowanej
Kalibratory 0 w surowicy bydlęcej z tymolem.	5 fiołek liofil.	żółty	Dodać 1 ml wody destylowanej
CAL N	2 fiolkki 3 ml	czarny	Gotowe do zastosowania.
Kalibratory 1 - 5 w surowicy bydlęcej z tymolem (dokładne wartości na etykietach fiolek)	2 fiolkki 3 ml	czarny	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
INC BUF	2 fiolkki 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
Roztwór płuczący (TRIS-HCl)	2 fiolkki 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH SOLN CONC	2 fiolkki 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
Kontrole 1 i 2 w plazma pochodzenia ludzkiego z tymolem	2 fiolkki liofil.	srebrny	Dodać 1 ml wody destylowanej

Uwaga: Do rozcieńczania próbek należy użyć kalibratora zerowego.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dostarczania objętości: 50 μl , 100 μl , 1 ml i 3 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastycznymi)
3. Pipeta do dostarczenia 1 - 5 ml wody destylowanej
4. Mieszadło wirowe
5. Mieszadło magnetyczne
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakkolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibratory:** Rekonstytuować kalibrator 0 przy pomocy 3 ml wody destylowanej a kalibrator 1 - 5 przy pomocy 1 ml.
- B. **Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 1 ml wody destylowanej.
- C. **Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wyłączyć pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują ważność do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Kalibratory i kontrolne są bardzo nietrwałe, dlatego należy po rekonstytucji natychmiast je wykorzystać, lub zamrozić w niewielkich objętościach w temperaturze -20°C przechowując przez maksymalnie 3 miesiące. Unikać cykli rozmrażania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znaczek izotopowy zachowuje ważność do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upłynięciu daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe probówki
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 100 μl każdej substancji do odpowiednich probówek.
3. Dozować 50 μl buforu inkubacyjnego do każdej próbówki z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania.
4. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej na miesiadle wirowym (400 obrotów/min).
5. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
6. Przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
7. Ponownie przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać).
8. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Dodać 100 μl anty-CA 125- ^{125}I (znaczek izotopowy) do wszystkich próbówek w tym do nieopłaszczonych próbówek do całkowitego zliczania.
10. Inkubować przez 60 minut w temperaturze pokojowej na miesiadle wirowym (400 obrotów/min).
11. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że

- plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
12. Przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
 13. Ponownie przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać).
 14. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
 15. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLCZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężeniu CA 125 (odcięta) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiście wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

CA 125-IRMA		cpm	B/T x 100 (%)
Zliczanie całkowite		299443	100
Kalibrator	0,0 U/ml 6,4 U/ml 16,2 U/ml 49,0 U/ml 157,0 U/ml 568,0 U/ml	349 1261 3752 12488 39441 124992	0,12 0,42 1,25 4,17 13,17 41,74

Ponieważ nie jest dostępny żaden międzynarodowy materiał referencyjny dla antygenu CA 125, wartości kalibratora DIAsource CA 125-IRMA są przedstawione zgodnie z wewnętrznymi standardami referencyjnymi.

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiążaniu zerowym kształtała się na poziomie 0,7 U/ml.

B. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Suwowica	N	X ± S.D. (U/ml)	CV %	Suwowica	N	X ± S.D. (U/ml)	CV %
A	20	31.5 ± 1.2	3.9	A	20	38.0. ± 2.0	5.3
B	20	120.8 ± 2.8	2.3	B	20	114.5 ± 5.7	5.0

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

C. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

CA 125 dodana (U/ml)	Stęž. zmierzona (U/ml)	Odzysk (%)
31,1	35,5	114 %
65,8	67,7	103 %
124,3	135,7	109 %
257,9	268,9	104 %
531,8	552,4	104 %

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęž. teoretyczne (U/ml)	Stęž. zmierzone (U/ml)
A	1/1	-	618,8
	1/2	309,4	310,7
	1/4	154,7	161,4
	1/8	77,4	80,9
	1/16	38,7	43,2
	1/32	19,3	21,6
	1/64	9,7	10,3

D. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dodowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbówek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE

	0'	10'	20'	30'
S 1 (U/ml)	35,9	37,2	39,3	38,5
S 2 (U/ml)	104,5	113,5	117,7	116,6

E. Efekt hook'a

Próbki zawierające 340.000 U/ml CA 125 dają wynik powyżej ostatniego punktu kalibracji.

F. Swoistość

Oznaczenie DIAsource CA 125 IRMA oparte jest na dwóch mysich przeciwciałach monoklonalnych, OvK95 i Ov185, skierowanych wobec dwóm niezależnym epitopom rdzenia białkowego antygenu CA 125.

XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywe zawyzione lub zanizione.
- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi *in vitro*. Pacjenci rutynowo eksponowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykietie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wśród 154 zdrowych ochotników 98% wyników było niższych od wartości 35,0 U/ml.

XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*. Zestaw zawiera ^{125}I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczane zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwca anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przenoszą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbками surowiczy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydęk sodowy jako środek konserwujący). Azydék znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ μl	KALIBRATORY μl	PRÓBKA(I) KONTROLE μl
Kalibratory (0-5) Próbki, kontrole Bufor inkubacyjny	- - -	100 - 50	- 100 50
Inkubacja	120 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 400 rpm		
Rozdzielenie Roztwór pluczący Rozdzielenie Roztwór pluczający Rozdzielenie	- - - - -	aspiracja 2.0 aspiracja 2.0 aspiracja	
Znacznik izotopowy	100	100	100
Inkubacja	60 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 400 rpm		
Rozdzielenie Roztwór pluczający Rozdzielenie Roztwór pluczający Rozdzielenie	- - - - -	aspiracja 2.0 aspiracja 2.0 aspiracja	
Zliczanie	Zliczanie próbówek przez 60 sekund		

XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J.
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.
3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.
CA 125 : The past and the future.
Int J Biol Markers 1998;13:179-187.
4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.
Tumor markers in gynaecological cancers : ESGO recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2807-2810.
5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER : NIH CONSENSUS CONFERENCE.
Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.
JAMA 1995;273:491-497.
6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.
How CA 125 is used in routine clinical practice.
Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.
7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.
Circulating tumor markers in ovarian tumors.
Forum (Genova) 2000;10:383-392.
8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.
Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.
Int J Biol Markers 2000;15:147-152.



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

CA 125-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имуорадиометричен набор за количествено определяне *in vitro* на туморния маркер CA 125 в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource CA 125-IRMA Kit
B. Каталожен номер: KIP0301: 96 теста
C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

СА 125 представлява муцинов глюкопротеин с високо молекулно тегло, първоначално дефиниран от моноклоналното антитяло Ос 125 (Mab), открито от Баст ет ал. За разработването на туморни изследвания с цел определянето на карциномния антиген CA 125 са използвани различни епитопи, проявлящи се заедно с епитопа Ос 125 в карциномния антиген CA 125.

B. Клинични приложения

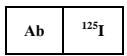
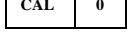
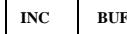
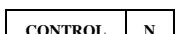
Приблизително 90% от туморите на яйчниците представляват целомни епителиални карциноми и съдържат глюкопротеин, свързан с целомния епител, обозначаван CA 125. СА 125 може да бъде открит в по-голямата част от серумните, ендометриоидните и светлоклетъчните овариални карциноми; този антиген се проявява муцинозните тумори в по-редки случаи. СА 125 може да се открие и в епитела на фалопиевите тръби, ендометриума и маточната шийка.

Повишението нива на СА 125 могат да се дължат на коремни заболявания, различни от овариалния рак. Въпреки че нивата на СА 125 се повишават в повечето случаи при пациенти с епителиален карцином на яйчниците, този антиген може да се прояви в редица гинекологични (например, ендометриум, фалопиева тръба) и негинекологични (например, панкреас, гърда, дебело черво, бял дроб) карциноми. Нивата на СА 125 често пъти се повишават и при метастазиране извън матката.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource CA 125-IRMA представлява двуетапно имунорадиометрично изследване, базирано на сепарация на покрити епруветки. Mab1, прихващащото антитяло, се прикрепва съм долната и вътрешната повърхност на пластмасова епруветка. Към нея се добавят калибратори или преби. След период на инкубация чрез измиване се отстранява случайния излишък на антигена. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антитела, маркирани с ^{125}I , завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Кит за анализ96	Цветен код	Пригответие
Епруветки, покрити с анти-CA 125 (моноклонални антитела)	2 x 48	оранжев	Готов за употреба
	1 флакон 10,5 ml 760 kBq	червен	Готов за употреба
Анти-CA 125- ^{125}I (моноклонални антитела) във фосфатен буфер с волски серумен албумин, азид (<0,1%), волски serum и инерна червена боя			
	1 флакон лиофилизиран	жълт	Добавете 3,0 ml дестилирана вода
Нулев Калибратор във волски serum с тимол			
	5 флакона лиофилизиранi	жълт	Добавете 1,0 ml дестилирана вода
Калибратори 1-5 във волски serum с тимол (виж точните стойности на етикетите на флаконите)			
	2 флакона 3 ml	черен	Готов за употреба
Инкубационен буфер: трисбуфер с малеат, с волски serumен албумин, волски serum и азид.			
	2 флакона 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
Измиващ разтвор (TRIS-HCl)			
	2 флакона лиофилизиранi	сребърен	Добавете 1,0 ml дестилирана вода
Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол			

Забележка: Използвайте нулевия калибратор за serumните разреждания.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- Дестилирана вода
- Пипети от: 50 μl , 100 μl , 1 ml и 3 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- Пипета за подаване на 1 до 5 ml дестилирана вода
- Завихрящ смесител
- Магнитен сепаратор
- Клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута)
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама бројч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 3 ml дестилирана вода, а другия калибратор – с 1,0 ml дестилирана вода.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 1,0 ml дестилирана вода.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измивачия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на дена.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- Калибраторите и контролите са твърде нестабилни, използвайте ги непосредствено сред реконституирането, замразете ги веднага в аликвоти и ги съхранявайте при -20°C в продължение на 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Пряко пригответия Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът и плазмата трябва да се съхраняват при температури 2 – 8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхраняването му при -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура.

Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба.

Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрели точността. Съобразявайте се с времето за инкубация.

Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 100 μl от всяко в съответните епруветки.
- Разпределете 50 μl инкубационен буфер във всяка епруветка, освен тези, предназначени за определяне на общия брой импулси.
- Инкубирайте в продължение на 120 минути при стайна температура върху клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дългото на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
- Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
- Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
- Разпределете 100 μl анти-CA 125 натоварен с ^{125}I од във всяка епруветка, включително тези за определяне на общия брой импулси.
- Инкубирайте за 1 час при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че

- пластмасовият край на аспиратора достига дългото на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивация разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
 - Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивация разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
 - Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
 - Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветки.
- На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на CA 125 и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
- Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
- Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4- параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

CA 125-IRMA		срм	B/T (%)
Общ брой		299443	100
Калибратор	0,0 U/ml 6,4 U/ml 16,2 U/ml 49,0 U/ml 157,0 U/ml 568,0 U/ml	349 1261 3752 12488 39441 124992	0,12 0,42 1,25 4,17 13,17 41,74

Тъй като за туморния маркер CA 125 няма наличен международен референтен материал, то стойностите на калибратора DIAsource CA 125-IRMA се определят на базата на редица вътрешни референтни стандарти.

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Дванадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0,7 U/ml.

B. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	$\bar{X} \pm S.D.$ U/ml	CV (%)	Серум	N	$\bar{X} \pm S.D.$ U/ml	CV (%)
A	20	31,5 ± 1,2	3,9	A	20	38,0 ± 2,0	5,3
B	20	120,8 ± 2,8	2,3	B	20	114,5 ± 5,7	5,0

C. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (U/ml)	Измерена концентрация (U/ml)
A	1/1	-	618,8
	1/2	309,4	310,7
	1/4	154,7	161,4
	1/8	77,4	80,9
	1/16	38,7	43,2
	1/32	19,3	21,6
	1/64	9,7	10,3

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Добавен CA 125 (U/ml)	Възстановен CA 125 (U/ml)	Възстановяване (%)
31,1	35,5	114 %
65,8	67,7	103 %
124,3	135,7	109 %
257,9	268,9	104 %
531,8	552,4	104 %

D. Закъснение между разпределението на последния калибратор и пробите

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

ЗАКЪСНЕНИЕ

	0°	10°	20°	30°
C 1 (U/ml)	35,9	37,2	39,3	38,5
C 2 (U/ml)	104,5	113,5	117,7	116,6

E. Ефект на кукичката

Пробите, съдържащи 340.000 U/ml CA125 дават резултат, по-висок от последната калибрационна стойност.

F. Специфичност

DIAsource CA 125 IRMA е базиран на две моноклонални антитела на мишки, OvK95 и Ov185, прицелени към два отделни епитопа на коровия протеин на антигена CA 125.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (HAMA). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
- Хетерофилните антитела в човешкия serum могат да реагират с реагентните иму ноглобулини, смущавайки ин витро иму нотестовете. Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофилни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела.

Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изисква допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни преби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лаборатория практика.

XVI. РЕФЕРЕНТИНИ ИНТЕРВАЛИ

98% от резултатите на 154 очевидно здрави индивида бяха под 35.0 U/ml. За диагностични цели резултатите, получавани на базата на това изследване трябва винаги да се използват в комбинация с клинични изследвания, медицинската история на пациента и други находки.

XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на краиния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извърши в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват независимо в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените пробы трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събираны от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекционни.

Избягвайте каквътто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. BAST R., FEENEY M., LAZARUS H., NADLER L., COLVIN R., KNAPP R.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J Clin Invest 1981;68:1331-1337.
2. O'BRIEN T., RAYMOND L., BANNON G., FORD D., HARDARDOTTIR H., MILLER F., QUIRK J.
New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope.
Am J Obstet Gynecol 1991;165:1857-1864.
3. BAST RC Jr., XU FJ., YU YH., BARNHILL S., ZHANG Z., MILSS GB.
CA 125 : The past and the future.
Int J Biol Markers 1998;13:179-187.
4. BONFRER JMG., DUFFY MJ., RADTKE M., SEGURADO O., TORRE GC., VAN DALEN A., et al.
Tumor markers in gynaecological cancers : EGTG recommendations.
Anticancer Res 1999;19:2807-2810.
5. NIH CONSENSUS DEVELOPMENTAL PANEL ON OVARIAN CANCER : NIH CONSENSUS CONFERENCE.
Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.
JAMA 1995;273:491-497.

6. PETIGNAT P., JORIS F., OBRIST R.
How CA 125 is used in routine clinical practice.
Eur J Cancer 2000;36:1933-1937.

7. VON SCHLIPPE M., RUSTIN GJ.
Circulating tumor markers in ovarian tumors.
Forum (Genova) 2000;10:383-392.

8. COLAKOVIC S., LUKIC V., MITROVIC L., JELIC S., SUSNjar S., MARINKOVIC J.
Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer.
Int J Biol Markers 2000;15:147-152.

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ μl	КАЛИБРАТОРИ μl	ПРОБА (И) КОНТРОЛ μl
Калибратори (0-5)	-	100	-
Проби, контроли	-	-	100
Инкубационен буфер	-	50	50
Инкубация	120 минути при стайна температура с разклащане 400 оборота в минута		
Сепарация	-	аспиррайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспиррайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспиррайте (или прелейте)	
Трейсър	100	100	100
Инкубация	60 минути при стайна температура с разклащане 400 оборота в минута		
Сепарация	-	аспиррайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспиррайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2 ml	
Сепарация	-	аспиррайте (или прелейте)	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		