

CA-125 kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung
des Cancer Antigens 125 in humanem Blutserum
(*Gebrauchsanweisung: Seite 3*)

Enzyme immunoassay for quantitative determination
of cancer antigen 125 in human serum
(*Instructions for use: page 28*)

Manueller Test / Manual test

Abschnitt / Section 13

Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 14



CA-125 Kit
(Manueller Test)



96 Untersuchungen
96 tests

30-01



CA-125 kit (manual test)

CA-125 Kit (Automatisierter
Test für "Alisei")











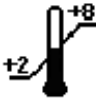



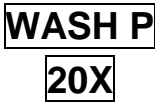











96 Untersuchungen
96 tests

30-01 A



CA-125 kit (automated test
for "Alisei")

1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Substrat Substrate
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Probenverdünnungspuffer Sample Diluent
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for < n > tests		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated
	Reizend Irritant		Konjugat Conjugate

Warning

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **CA-125 Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung** des **Cancer Antigens 125 (CA-125)** im humanen Blutserum bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

- REF 30-01** Für den manuellen Gebrauch;
REF 30-01 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei",
hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

- Abschnitt 13 Manueller Test;
Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkit:*

- REF 30-01 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";
REF 30-01 nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

CA-125 ist ein Mykoglykoprotein mit einem Molekulargewicht über 200 kDa. Normalerweise kommt es in Erwachsenen in zwei Formen vor: frei oder membrangebunden. Das membrangebundene Antigen befindet sich auf der Epithelzelloberfläche der Eileiter, des Gebärmutterhalses (Zervix), der Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium), der Bronchien sowie der Schweiß- und Milchdrüsen.

In freier Form kommt CA-125 in hohen Konzentrationen in Samenflüssigkeit, der Muttermilch, Scheidenabsonderungen, dem Speichel sowie bronchoalveolären und intraperitonealen Flüssigkeiten vor. Im Blutkreislauf ist CA-125 in geringen Konzentrationen vorhanden. Eine Steigerung der CA-125-Konzentration im Blutserum weist auf verschiedene Pathologien der Eierstöcke hin (benigne oder maligne).

Die quantitative Bestimmung der CA-125-Konzentration im Blutserum wird zum Monitoring von Patienten mit Eierstockkrebs zur Abschätzung der Behandlungseffizienz, der Früherkennung von Rückfällen und asymptomatischer Metastasierung des Resttumors genutzt.

Die diagnostische Bedeutung der Methode hängt meistens von der Histologie des Tumors ab. Zum Beispiel ist die CA-125-Bestimmung sehr wichtig bei der Diagnostik eines serösen Eierstockkarzinoms im Vergleich zu anderen Karzinomtypen (z.B. muzinösen Karzinom).

3. TESTPRINZIP

Der **CA-125 Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des CA-125-Moleküls binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite mit Biotin. Die CA-125-Moleküle der Blutserumprobe binden beide Antikörper und werden an der Kavitätenoberfläche, die mit Streptavidin beschichtet ist, immobilisiert (Abb. 1). Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt.

Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur CA-125-Konzentration in der Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist direkt proportional zur CA-125-Konzentration der Probe. Die CA-125-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

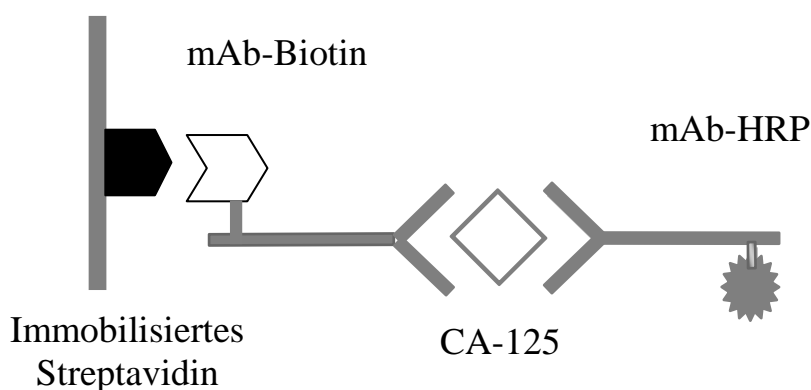


Abb. 1 Testschema

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **CA-125 Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C vorzugsweise in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Verfallsdatum zu lagern.

Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 15 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren, Kontrolle (gebrauchsfertig), bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 3 Monate nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**.
- Geöffnete Fläschchen des Trial- und Waschlösung-Konzentrates, Probenverdünungspuffer und der Stopplösung: bei +2...+8 °C innerhalb der gesamten Haltbarkeitsdauer;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert

werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von $+2...+8$ °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Ein CA-125-Konzentrationsbereich bis zu 35 U/ml wird als normal angesehen. Eine höhere CA-125-Konzentration findet sich bei 50% der Frauen mit primären Eierstockkrebs und bei 80% der Frauen mit metastasierendem Eierstockkrebs. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die CA-125–Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der

Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Mikrotiterplatte

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten: Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten: Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst. Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt. 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die Flaschen der Kalibratoren und der Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert. Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es

darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem Wasser:

14 ml **WASH P** **20X** + 266 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB **Substrat** vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

Ist die erwartete CA-125-Konzentration der Probe höher als die des Kalibrators 5, sollte die Probe mit dem Probenverdünnungspuffer **DIL** nacheinander 20fach und 400fach verdünnt werden:

Probe 1 (**20fache Verdünnung**):

190 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Serumprobe;
gründlich mischen

Probe 2 (**400fache Verdünnung**):

190 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Probe 1;
gründlich mischen.

Ist die erwartete CA-125-Konzentration der Probe 2 höher als die des Kalibrators 5, sollte die Probe mit dem Probenverdünnungspuffer **DIL** wie folgt verdünnt werden:

Probe 3 (**800fache Verdünnung**):

100 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 100 µl Probe 2,
gründlich mischen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **CA-125 Testkit** wurde gegen einen internen Hersteller-Standard kalibriert.

10.2 Spezifität:

Es wurde keine Kreuzreaktion zwischen den im Assay verwendeten monoklonalen Anti-CA-125-Antikörpern und den Krebsantigenen CEA, CA-19-9, CA-15-3 und CA-72-4 nachgewiesen. Jedoch wurde berichtet, dass bei einer erhöhten Biotinaufnahme durch den Patienten eine Biotin-Interferenz mit dem Immunoassay stattfinden kann, die zu falschen Ergebnissen führen würde.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **CA-125 Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 1,6 U/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Die **CA-125 Testkits (manuelles und Alisei Testkits)** sind validiert für die Detektion eines CA-125-Konzentrationsbereiches (unverdünnt) von 1,6 - 1000 U/ml validiert.

10.5 High-Dose-Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt des **CA-125 Kits** wurde bis zu Konzentrationen von 24 000 U/ml nicht beobachtet.

10.6 Präzision (Intra-Assay und Inter-Assay Varianz):

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere CA-125-Konzentration, U/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	17,1	1,7	7,6
2	46,9	3,9	8,1
3	93,9	7,5	6,4
4	245,6	16,8	7,4
5	349,6	18,7	5,7
6	431,3	25,9	6,7
7	832,5	56,5	8,0
8	880,0	48,1	6,6

Alisei Testkit

Probe	Mittlere CA-125-Konzentration, U/ml	Intra-Assay VK	
		SD	Vk, %
1	21,3	1,2	5,4
2	42,7	1,4	3,3
3	73,9	2,5	3,5
4	182,8	7,9	4,3
5	267,2	10,0	3,7
6	414,0	19,1	4,6
7	638,2	8,0	1,3
8	876,2	11,7	1,3

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen.

Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere CA-125 Konzentration, U/ml			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	29,9	32,447	31,65	1,26	4,0
2	59,4	54,512	58,727	2,66	4,6
3	114,1	100,01	104,38	7,19	6,8
4	369,6	323,9	346,1	22,87	6,6
5	444,7	392,51	413,77	26,23	6,3
6	506,2	531,7	533,77	15,33	2,9
7	718,4	687,1	714,4	17,0	2,4
8	923,7	935,0	895,2	20,5	2,2

Alisei Testkit

Probe	Mittlere CA-125 Konzentration, U/ml			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	21,3	22,8	20,6	1,12	5,1
2	42,7	44,2	41,8	1,21	2,8
3	73,9	70,0	72,4	1,97	2,7
4	182,8	196,7	200,3	9,24	4,8
5	267,2	290,3	276,8	11,60	4,2
6	414,0	398,6	438,0	19,86	4,8
7	638,2	659,4	641,8	11,34	1,7
8	876,2	895,8	868,0	14,28	1,6

10.7 Linearitätstest:

Serielle Verdünnungen dreier humaner Blutserumproben mit bekannter CA-125–Konzentration wurden mit dem **CA-125 Testkit** untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:


Probe	Verdünnung	Gemessene Konzentration, U/ml	Erwartete Konzentration, U/ml	Gemessene/ erwartete Konzentration Ratio, %
1	Unverdünnt	703,4		
	1:2	321,0	351,8	109,6
	1:4	170,3	175,8	103,3
	1:8	87,3	87,9	100,7
	1:16	48,6	44,0	90,4
2	Unverdünnt	329,9		
	1:2	153,1	165,0	93,0
	1:4	234,5	82,5	105,0
	1:8	82,5	41,2	96,0
3	Unverdünnt	306,2		
	1:2	157,5	153,13	103,0
	1:4	82,7	76,56	108,0
	1:8	41,1	38,28	107,0




11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;

- Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
- Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden.
Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, jedes Mal die CA-125-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.
-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen,
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **DIL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 30-01)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit Streptavidin	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-CA-125-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP) und monoklonalen Anti-CA-125-Antikörpern konjugiert mit Biotin	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	CA-125 Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter CA-125-Konzentration: 0; 25; 100; 250; 500; 1000 U/ml/(ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen CA-125-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	CA-125 Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter CA-125-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische CA-125-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert

STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
DIL	Probenverdünnungspuffer	3 ml, gebrauchsfertig
	Klebeschutzfolie	2x1 Folie (optional)

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-750 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **CA-125 Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Leerwertes (Blank= OD der TMB-Lösung).

13.3.1. Assay-Durchführung

Anmerkung: Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

Anmerkung: Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

Alle Proben sollten in Doppelbestimmung getestet werden.

A. 50µl der Kalibratoren **CAL, Kontrolle **CONTROL** und vorbereiteten Serumproben in Zweifachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren.**

Kavitäten A1, A2 bleiben frei (Blank);

B. 150 µl Konjugat **CONJ in alle Kavitäten außer A1, A2 (Blank) pipettieren.**

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

C. 60 Minuten bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 750 rpm**) inkubieren.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.

E. 100 µl Substrat **SUB** in jede Kavität pipettieren; entweder Streifen bei **Raumtemperatur** (+18...+25 °C) **im Dunkeln** für **15–30 Minuten** abhängig von der Farbintensität oder für **10 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500-750 rpm**) inkubieren.

F. 100 µl Stopplösung **STOP** in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur** (+18...+25 °C) **schütteln**.

G. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm** innerhalb von **20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;
OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (für OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,09$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5 $\geq 1,500$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren bei 450 nm werden gegen deren jeweilige CA-125-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Der Mittelwert der Blank-OD dient dem Nullstellen des Photometers.

Eine Extrapolation der Standardkurve für CA-125-Konzentrationswerte, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten, ist nicht zulässig.

In diesem Fall sollten die Proben entsprechend Abschnitt 9 verdünnt werden. Die gemessene Konzentration der verdünnten Probe muss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

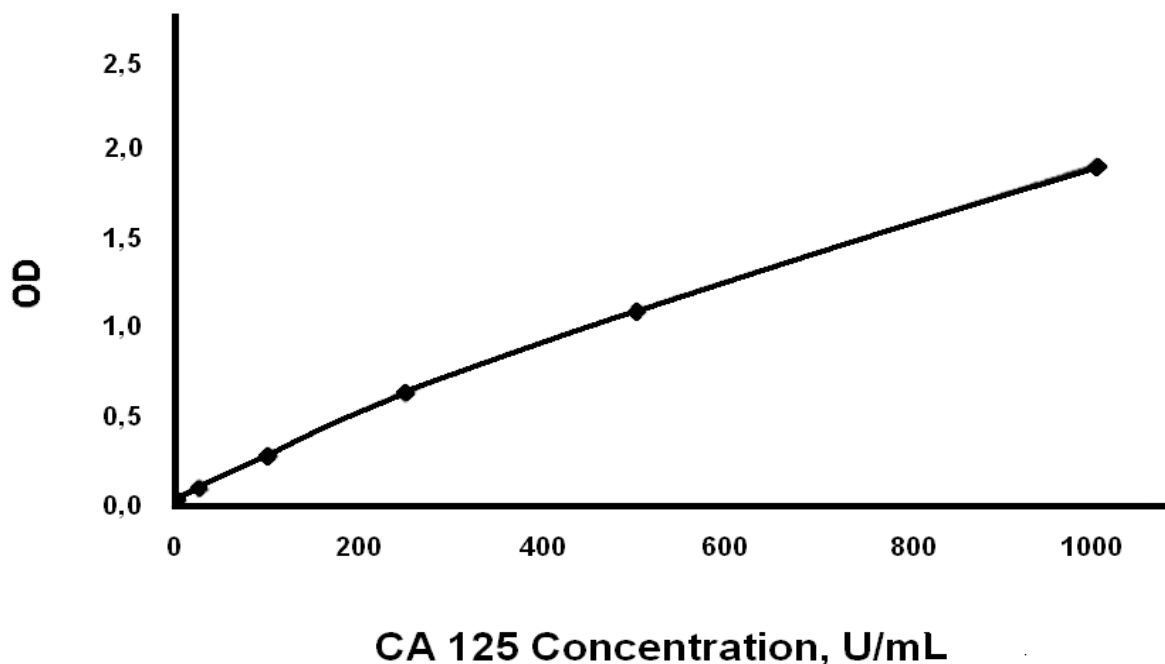


Abb.2 Typische Standardkurve

Beispiel-standard-kurve! Nicht zur Auswertung benutzen.

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Reagenz \ Kavität	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
CAL CONTROL	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
CONJ	–	150 µl	150 µl
Inkubation No.1	60 Min, +37 °C, 500–750 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln oder		
	10 Min, +37 °C, 500–750 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 30-01 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit Streptavidin	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-CA-125-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP) und monoklonalen Anti-CA-125-Antikörpern konjugiert mit Biotin	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	CA-125 Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter CA-125-Konzentration: 0; 25; 100; 250; 500; 1000 U/ml (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische CA-125-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen CAL 2,4- 2×0,5ml; CAL 0,1,3,5-1×0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	CA-125 Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter CA-125-Konzentration. Der CA-125-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	2x 19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu beziehen
DIL	Probenverdünnungspuffer: Proteinpuffer	3,0 ml, gebrauchsfertig

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 2 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt.

Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhrchen 12x75, Volumen: 5,0 ml;
- **TRIAL** **5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert*
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **CA-125 Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder entionisiertem Wasser:

* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden

2 ml **TRIAL 5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

*14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschriffe, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der CA-125-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4. Datenverarbeitung

14.4.1. Datenverarbeitung (OD gemessen bei 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes 13.4.1

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um den möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **CA-125 kit** is provided for the **quantitative determination of cancer antigen-125 (CA-125)** in human serum.

This test has 2 complete sets:

REF 30-01 for manual use;

REF 30-01 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use are described in:

section 13 for manual test,

section 14 for analyser

Note 1: *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of the test*

REF 30-01 A *only on analyser “Alisei”,*

REF 30-01 *only for manual use.*

While using a non-predefined method of use it is under end user responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

CA-125 is a mucoglycoprotein with a molecular weight of over 200 kDa. Normally in adults CA-125 exists in two forms: free and membrane-bound. Membrane-bound antigen can be identified on the surface of epithelial cells of fallopian tubes, cervix, endometrium, bronchi, mammary gland and sudoriferous gland.

High concentrations of free form can be detected in seminal liquid, breast milk, vaginal secretions, saliva, bronchoalveolar and intraperitoneal liquids.

In bloodstream CA-125 persists in low concentrations. Increased concentration of serum CA-125 is a sign of ovarian pathology (either benign or malignant).

Quantitative determination of serum CA-125 is used for monitoring of patients with ovarian cancer for estimation of treatment efficiency, early identification of recurrences and asymptomatic dissemination of residual tumor. Diagnostic value of method depends on histological type of tumor: it is the highest in the case of serous ovarian carcinomas in comparison with other types of carcinoma (e.g. mucinous carcinoma).

3. PRINCIPLE OF TEST

The CA-125 kit is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of CA-125 molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is conjugated with biotin. CA-125 molecules from the serum sample bound to both antibodies and are immobilized onto the inner surface of microwells coated with streptavidin.

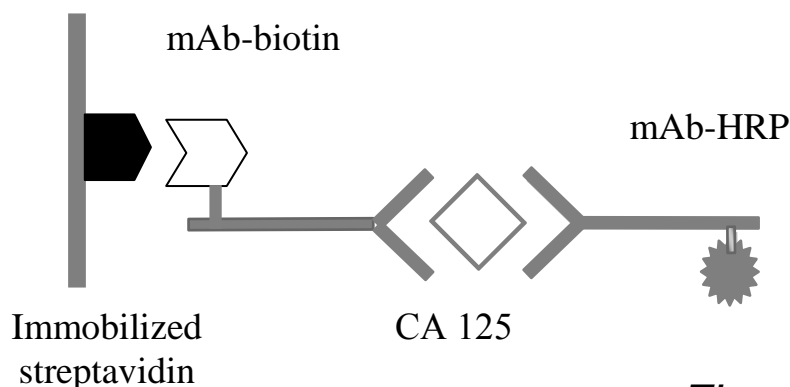


Fig. 1 Assay Scheme

Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells.

Quantity of bound conjugate is directly proportional to CA-125 level in tested sample. During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to CA-125 concentration in specimens.

CA-125 concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

Expiry date of the kit is printed on the box label; expiry date for each component is printed on the respective label.

The **CA-125 kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until expiration date.

Storage at +25 °C is allowed but for no more than 15 days.

Shelf life of the kit is 18 months. After initial opening, the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows, but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag: at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for no more than 12 months after opening; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 3 months after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;

- vials with concentrated Trial, sample diluent, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date.
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

The range of CA-125 concentration up to 35 U/mL was classified as normal. CA-125 concentration is above normal in 50% of women with primary ovarian cancer and in 80% of women with metastatic ovarian cancer. These limits should be considered as guidelines only.

It is highly recommended each laboratory determine its own reference range of CA-125 concentrations.

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPERATION

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

MP Microplate

Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter.

Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

14 mL **WASH P** **20X** + 266 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

If the expected CA-125 concentration in the sample is higher than concentration of **calibrator 5**, the sample should be diluted consistently 20-fold and 400-fold with **sample diluent** **DIL** as follows:

Sample 1 (**20-fold dilution**):

190 µL sample diluent **DIL** + 10 µL serum sample
mix thoroughly

Sample 2 (**400-fold dilution**):

190 µL sample diluent **DIL** + 10 µL Sample 1
mix thoroughly

If the expected CA-125 concentration in the Sample 2 is higher than in **calibrator 5**, the sample should be diluted with **sample diluent DIL** as follows:

Sample 3 (**800-fold dilution**):

100 µL sample diluent **DIL** + 100 µL Sample 2
mix thoroughly.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration-Traceability:

The CA-125 kit was calibrated via internal manufacturer standard.

10.2. Specificity:

No cross-reaction between anti-CA 125 monoclonal antibodies used in the assay and CEA, CA 19-9, CA 15-3 and CA 72-4 cancer antigens was detected. However, it have been reported that in case of increased biotin uptake by patients, biotin interference with immunoassays might take place which may lead to false results.

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **CA-125 kit** i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator is 1.6 U/mL. It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two standard deviations.

10.4. Measurement Range:

The **CA-125 kits** (manual and Alisei kits) were validated for measurement of CA-125 concentration within the concentration diapason (without dilution) of 1.6 – 1000 U/mL.

10.5. Hook Effect:

For **CA-125 kit** high dose hook effect was not detected for concentrations up to 24 000 U/mL.

10.6. Precision (intra- and inter-assay CV)

To determine **intra-assay CV** 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean CA 125 concentration, U/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	17.1	1.7	7.6
2	46.9	3.9	8.1
3	93.9	7.5	6.4
4	245.6	16.8	7.4
5	349.6	18.7	5.7
6	431.3	25.9	6.7
7	832.5	56.5	8.0
8	880.0	48.1	6.6

Alisei kit

Sample	Mean CA 125 concentration, U/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	21.3	1.2	5.4
2	42.7	1.4	3.3
3	73.9	2.5	3.5
4	182.8	7.9	4.3
5	267.2	10.0	3.7
6	414.0	19.1	4.6
7	638.2	8.0	1.3
8	876.2	11.7	1.3

To determine **Inter-Assay** CV 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean CA 125 concentration, U/mL			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	29.9	32.447	31.65	1.26	4.0
2	59.4	54.512	58.727	2.66	4.6
3	114.1	100.01	104.38	7.19	6.8
4	369.6	323.9	346.1	22.87	6.6
5	444.7	392.51	413.77	26.23	6.3
6	506.2	531.7	533.77	15.33	2.9
7	718.4	687.1	714.4	17.0	2.4
8	923.7	935.0	895.2	20.5	2.2

Alisei kit

Sample	Mean CA 125 concentration, U/mL			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	21.3	22.8	20.6	1.12	5.1
2	42.7	44.2	41.8	1.21	2.8
3	73.9	70.0	72.4	1.97	2.7
4	182.8	196.7	200.3	9.24	4.8
5	267.2	290.3	276.8	11.60	4.2
6	414.0	398.6	438.0	19.86	4.8
7	638.2	659.4	641.8	11.34	1.7
8	876.2	895.8	868.0	14.28	1.6

10.7 Dilution Parallelism of Serum Samples:

Serial dilutions of three human serum samples with predetermined CA-125 concentration in sample diluent were assayed with CA-125 kit with the following result:

Sample	Dilution	Measured concentration, U/mL	Expected concentration, U/mL	Measured /expected concentration ratio, %
1	Undiluted	703.4		
	1:2	321.0	351.8	109.6
	1:4	170.3	175.8	103.3
	1:8	87.3	87.9	100.7
2	1:16	48.6	44.0	90.4
	Undiluted	329.9		
	1:2	153.1	165.0	93.0
	1:4	234.5	82.5	105.0
	1:8	82.5	41.2	96.0
	Undiluted	306.2		


Sample	Dilution	Measured concentration, U/mL	Expected concentration, U/mL	Measured /expected concentration ratio, %
3	1:2	157.5	153.13	103.0
	1:4	82.7	76.56	108.0
	1:8	41.1	38.28	107.0

11. LIMITATION OF THE METHOD




Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after expiry date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.

- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit. dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators. control and samples must not exceed 15 min;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time CA-125 concentration in the control;
 - remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral

agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.

-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;

- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 30-01)

13.1. Materials Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with streptavidin	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-CA-125 monoclonal antibodies conjugated with HRP and anti-CA-125 monoclonal antibodies conjugated with biotin	18 mL, ready to use
0-5 CAL	CA-125 calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known CA-125 concentrations – 0; 25; 100; 250; 500; 1000 U/mL. (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific CA-125 concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	CA-125 control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known CA-125 concentration. The range of CA-125 concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of CA-125 concentration see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated

STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent	3.0 mL, ready to use
	Adhesive foil	2x1 foil (optional)

13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
 - 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
 - microplate incubator (+37 C) or microplate incubator/shaker (+37°C, 500–750 rpm);
 - manual or automatic equipment for rinsing wells;
 - calibrated microplate reader (450 nm);
 - vortex tube mixer;
 - deionized or distilled water;
 - graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
 - latex or plastic gloves;
 - trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
 - disinfectant;
- absorbent material (for manual wash)

13.3. Test Procedure

The **CA-125 kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1. Assay Procedure

Note: *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

Note: *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

All samples should be tested in duplicates.

- A.** Pipette **50 μ L** of calibrators **CAL**, control **CONTROL** and **patient's samples** in duplicates, into the respective wells **except wells A1-A2 (blank)**;
- B.** Pipette **150 μ L** conjugate **CONJ** into each well **except wells A1-A2**.

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

C. Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–750 rpm).**

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

D. Wash 5 times, as described below.

E. Pipette **100 µL** of **substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (500-750 rpm) at +37 °C.**

F. Pipette **100 µL** of **stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature (+18...+25°C).**

G. Read OD at **450 nm within 20 minutes.**

13.3.2. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 μ L of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.
-

13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{\underline{2.22}}$

13.4.1. Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.09 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.5 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown in the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2. Quantitative determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective CA-125 concentrations using **4PL** or **5PL** fit (Fig. 2 Typical standard curve). The arithmetical mean OD of the two «Blank» wells is used for zero setting of device.

Any extrapolation of the standard curve to CA-125 concentration above the nominal value of calibrator 5 is forbidden. In this case the sample should be additionally diluted accordingly to 9. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by corresponding dilution factor.

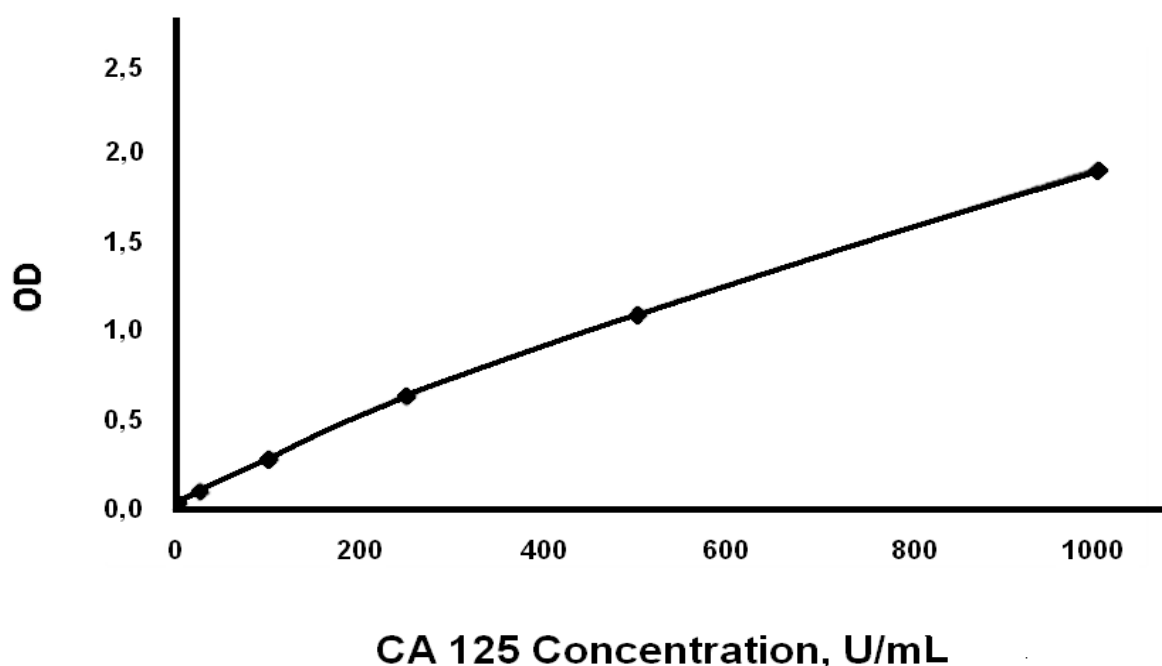


Fig. 2 Example of typical standard curve

13.5 Do not use for evaluation of real assay data!

13.5. Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells		CAL	
	«Blank»		CONTROL	Samples
CAL	–		50 µL	–
CONTROL	–			–
Samples	–		–	50 µL
CONJ	–		150 µL	150 µL
Incubation No.1	60 min. +37 °C. 500–750 rpm			
WASH P (diluted)	5 x 300 µL			
SUB	100 µL		100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min. +18...+25 °C. in the dark or			
	10 min. +37 °C. 500–750 rpm			
STOP	100 µL		100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min. +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

14. AUTOMATIC TEST (REF 30-01 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with streptavidin	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-CA-125 monoclonal antibodies conjugated with HRP and anti-CA-125 monoclonal antibodies conjugated with biotin	18 mL, ready to use
0-5 CAL	CA-125 calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known CA-125 concentrations – 0; 25; 100; 250; 500; 1000 U/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific CA-125 concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	8 vials, 0.5 mL each: CAL 2, 4 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 1, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	CA-125 control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known CA-125 concentration. For lot specific ranges of CA-125 concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	2x 19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order.
DIL	Sample diluent	3.0 mL, ready to use

Note: Extra vials of **CAL** 2, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.0 mL;
- **TRIAL** **5000X** Trial solution, 5000X concentrated*;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

CA-125 kit is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

Note: Preparation of other reagents see in section 8.

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

* reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order

2 mL **TRIAL** **5000X** + 9998 mL water
Mix thoroughly, avoid foaming.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation CA-125 concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD 450 nm)

See criteria in section 13.4.1.

14.5. Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August, 23, 2019



Astra Biotech GmbH

Rudower Chaussee 29,

12489 Berlin, Germany

Telefon: +49 (0)30 74696509

E-Mail: info@astrabiotech.de

www.astrabiotech.de