

# CEA

CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of CEA in human serum

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von CEA in humanem Serum

## Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 12
Bibliography/ Literatur	Page/ Seite	15
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung	Page/ Seite	16

## 1. INTRODUCTION

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein, with a molecular weight of 180 kDa, involved in cell adhesion. It is normally produced during fetal development, but the production of CEA stops before birth. Therefore, it is not usually present in the blood of healthy adults, although levels are raised in heavy smokers. CEA was identified in human colon cancer tissue extracts. It was later found that serum from individuals with colorectal and other carcinomas had higher levels of CEA than healthy individuals and can be used to monitor the response to colon cancer treatment.

CEA and related genes make up the CEA family belonging to the immunoglobulin superfamily.

The most frequent cancer which causes an increased CEA is cancer of the colon and rectum. Others include cancers of the pancreas, stomach, breast, lung, and certain types of thyroid and ovarian cancer. Benign conditions which can elevate CEA include smoking, infections, inflammatory bowel disease, pancreatitis, cirrhosis of the liver, and some benign tumors in the same organs in which an elevated CEA indicates cancer. Chemotherapy and radiation therapy can cause a temporary rise in CEA due to the death of tumor cells and release of CEA into the blood stream. Benign tumours do not usually cause an increase above 10 ng/ml.

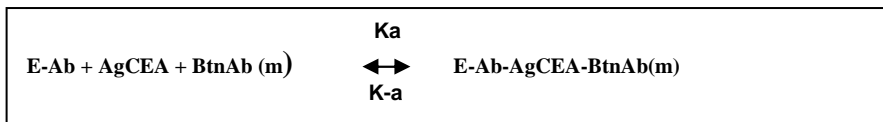
## 2. INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CEA in human serum.

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

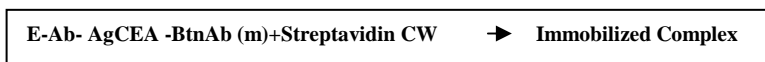
In this method, CEA standards, patient specimens and/or controls containing the native antigen are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and horseradish peroxidase (HRP) labelled antibodies are added and the reactants are mixed. The different types of antibodies used have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of CEA. Reaction between the various CEA antibodies and native CEA occurs in the microwells without competition or sterics hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



BtnAb(m)	Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)
AgCEA	Native Antigen (Variable Quantity)
E-Ab	enzyme labelled Antibody (Excess Quantity)
HRP-Ab(p)-AgCEA-BtnAb(m)	Antigen-Antibodies Sandwich Complex
Ka	Rate Constant of Association
K-a	Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is fixed to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



Streptavidin CW      Streptavidin immobilized on well.  
Immobilized Complex    Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by aspiration. The native antigen concentration is directly proportional to the HRP activity in the antibody-bound fraction. The activity of the conjugated HRP is quantitated by reaction with TMB substrate to produce blue colour. The reaction is terminated by adding stop solution which turns the blue colour into yellow. The absorbance is measured on a plate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

- **Coated Microplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with streptavidin; in aluminium foil.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 13 ml of horseradish peroxidase labelled anti- CEA antibodies and biotinylated monoclonal mouse anti-CEA antibodies.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 50x conc.:** 1 bottle containing 20 ml (NaCl 45 g/l, Tween 20 55 g/l)

- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Standards:** 6 bottles containing 1 ml standard solution. They are human serum based and were calibrated using a reference preparation which was assayed against the 1<sup>st</sup> IRP 73/601. They have approx. the following concentration:
 

Standard 0	0 ng/ml
Standard 1	5 ng /ml
Standard 2	10 ng /ml
Standard 3	25 ng /ml
Standard 4	50 ng /ml
Standard 5	250 ng /ml

## 4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver a volume of 100 µl
- Distilled water
- Timer

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

The closed reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark. Opened reagents are stable for 60 days when stored at 2...8 °C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

*It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28°C) before starting the test run!*

### 6.1. Coated microplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with streptavidin. Store at 2...8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C. Do not remove the adhesive sheets on the unused strips.*

### 6.2. Conjugate

The conjugate is ready to use.

### 6.3. CEA Standards

The standards are ready to use.

### 6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 12 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

### 6.5. Stop Solution

The bottle contains 12 ml 0.15 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

### 6.6 Wash Solution

Dilute contents of wash buffer concentrate 50x to 1000 ml with distilled water in a suitable storage container. For smaller volumes respect the 1:50 ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8°C.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

The specimens shall be blood, serum in type and the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed. For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained. The blood should be collected in a plain redtop venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimen (s) cannot be assayed within this time, the sample(s) may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

Patient specimens with CEA concentrations above 250 ng/ml may be diluted with Standard 0 and re-assayed.

When assayed in duplicate, 0.050ml of the specimen is required.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	e.g. A1)	for blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5

*It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.*

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 25 µl standards and samples (and controls) into their respective wells.
2. Dispense 100 µl conjugate in each well. Cover with a foil.
3. **Incubate for 60 min at room temperature (22 – 28°C) .**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

*Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.*

5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for 15 min at room temperature (+22...+28°C) in the dark.**
7. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*
8. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm within 30 min after addition of stop solution against blank.

## 9. QUALITY CONTROL

---

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of CEA for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercept of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

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

## 10. RESULTS

---

### 10.1. Note

The optical densities (O.D.) of some standards and samples may be higher than 2.0, in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (= wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm (peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where  $OD_{450}/OD_{405} = 3.0$ ), that is:  $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3.0$ .

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his own reader.

The OD of standard 5 should be  $\geq 1.3$ .

### 10.2. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Use the 4 Parameter Logistic or smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

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

### 10.3. Reference values

Non-smoker < 5 ng/ml

Smoker < 10 ng/ml

## 11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 11.1. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CEA that can be distinguished from the standard 0 is 0.11 ng/ml at the 95 % confidence limit.

### 11.2. Specificity

In order to assess the specificity of the antibody pair used for the CEA Elisa assay, massive doses of related analytes were spiked in a pool of patient sera:

Analyte	Concentration	Cross Reaction
CEA		100 %
$\beta$ -HCG	250 ng/mL	ND
AFP	5000 ng/mL	ND
CA-125	1000 U/mL	ND
PSA	1000 ng/mL	ND
CA 19-9	1000 U/mL	ND

### 11.3. Precision

#### Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (16x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is  $\leq 5.8\%$ .

#### Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (20x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is  $\leq 9.9\%$ .

## 11.4. Correlation with RIA

The NovaTec CEA ELISA was compared to another commercially available CEA assay. 167 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated

$$y = 1.019 \cdot x - 0.200$$

$$r^2 = 0.992$$

y = CEA Predicate kit

x = CEA NovaTec kit

## 11.4. Accuracy

The recovery of amounts of 10 - 20 - 40 ng/mL of CEA added to samples gave an average value ( $\pm$ SD) of 100.7%  $\pm$  7.2% with reference to the original concentrations.

## 12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

CEA has a low clinical sensitivity and specificity as a tumour marker. Clinically an elevated CEA value alone is not of diagnostic value as a test for cancer and should only be used in conjunction with other clinical manifestations (observations) and diagnostic parameters. There are patients with colorectal cancer that do not exhibit elevated CEA values and elevated CEA values do not always change with progression or regression of disease. Smokers demonstrate a higher range of baseline values than non-smokers.

## 13. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV 1+2 antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Do not use heavily haemolysed or highly lipemic samples.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants.
- This method allows the determination of CEA from 5.0 to 250 ng/ml.
- Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, sulphuric and preservatives, which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth.

<b>WARNING:</b> Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
--

## 13.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

## 14. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.:

DNOV060

CEA (96 Determinations)

## 1. EINLEITUNG

Das carcino-embriale Antigen (CEA) ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, das in die Zelladhäsion involviert ist. Es wird während der fetalen Entwicklung produziert. Die Produktion stoppt vor der Geburt. Im Blut von Erwachsenen ist es daher normalerweise nicht nachweisbar, obwohl der Level bei Rauchern erhöht sein kann. CEA wurde in humanen Kolonkrebsextrakten identifiziert. Später wurde entdeckt, dass Personen mit verschiedenen Karzinomen höhere CEA Gehalte im Serum aufweisen als gesunde Individuen. Daher kann der CEA Wert zum Monitoren des Therapieerfolges verwendet werden.

CEA und verwandte Gene, die die CEA Familie bilden, gehören zur Immunglobulin Superfamilie.

Die häufigsten Krebsarten, die zu einem Anstieg des CEA Gehaltes führen sind Dick- und Enddarmkrebs. Weiterhin steigt der CEA Level bei Pankreas-, Magen-, Brust-, Lungen- und bestimmten Typen von Schilddrüsen- und Eierstockkrebs.

Gutartige Bedingungen, die den CEA Wert erhöhen können sind: Rauchen, Infektionen, entzündliche Darmerkrankungen, Leberzirrhose und einige gutartige Tumoren in den gleichen Organen in denen ein erhöhter CEA Wert Krebs anzeigt. Chemotherapie und Bestrahlung können zu einem temporären Anstieg des CEA führen, ausgelöst durch den Tod der Tumorzellen und die damit verbundene Freisetzung von CEA in den Blutkreislauf. Gutartige Tumoren erzeugen in der Regel keinen CEA Anstieg auf Werte über 10 ng/ml.

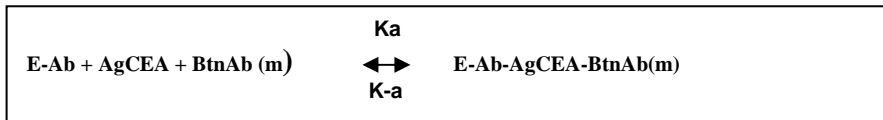
## 2. VERWENDUNGSZWECK

Immunoenzymatische kolorimetrische Methode zur Quantifizierung von CEA in humanem Serum.

## 3. TESTPRINZIP

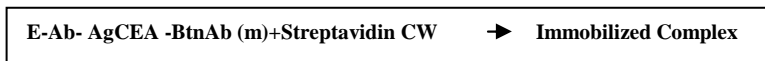
CEA Standards, Patientenproben und/oder Kontrollen, die alle das native Antigen enthalten, werden zuerst in die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend werden biotinylierte monoklonale und mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte Antikörper zugegeben und gemischt. Die verwendeten Antikörper haben eine hohe Affinität und Spezifität und sind gegen unterschiedliche distinkte Epitope des CEA gerichtet. Die Reaktion zwischen den verschiedenen CEA Antikörpern und dem nativen CEA findet in der Mikrotiterplatte ohne Konkurrenz oder sterische Behinderung statt. Es entsteht ein löslicher Sandwich Komplex.

Die Interaktion wird durch die folgende Gleichung illustriert:



BtnAb(m)	Biotinylierte monoklonale Antikörper (Überschuss)
AgCEA	Natives Antigen (unterschiedliche Menge)
E-Ab	Enzymmarkierte Antikörper (Überschuss)
HRP-Ab(p)-AgCEA-BtnAb(m)	Antigen-Antikörper Sandwich Komplex
Ka	Assoziationskonstante
K-a	Dissoziationskonstante

Gleichzeitig bindet der Komplex aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin und Biotin an die Mikrotiterplatte. Diese Interaktion wird durch die folgende Gleichung dargestellt:



Streptavidin CW Streptavidin immobilisiert an der Mikrotiterplatte  
Immobilized Complex Antikörper-Antigen Sandwich Bindung

Nachdem sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, wird die gebundene Antikörperfraktion durch Absaugen von dem ungebundenen Antigen getrennt. Die Konzentration des nativen Antigens ist direkt proportional zu der HRP-Aktivität in der Antikörper-gebundenen Fraktion. Die Aktivität der konjugierten HRP wird über die Farbentwicklung der TMB Reaktion quantifiziert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Stopplösung beendet wodurch die blaue Farbe gelb wird. Die Absorption wird mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

## 4. MATERIAL

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Beschichtete Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Streptavidin; in Aluminiumbeutel.

- **Konjugate:** 1 Flasche mit 13 ml HRP markierten anti- CEA Antikörpern und biotinylierten monoklonalen Maus anti-CEA Antikörpern.
- **TMB Substrat Solution:** 1 Flasche mit 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/l) (Hautkontakt vermeiden).
- **Waschlösung 50x konz.:** 1 Flasche mit 20 ml (NaCl 45 g/l, Tween 20 55 g/l)
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.15 mol/l (Hautkontakt vermeiden).
- **Standards:** 6 Flaschen mit je 1 ml Standardlösung. Die auf Humanserum basierenden Standards wurden mit einer Referenzpräparation kalibriert, die gegen den 1 IRP 73/601 gemessen wurde. Sie haben ungefähr folgende Konzentration:
 

Standard 0	0 ng/ml
Standard 1	5 ng /ml
Standard 2	10 ng /ml
Standard 3	25 ng /ml
Standard 4	50 ng /ml
Standard 5	250 ng /ml

## 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

## 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450 nm
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipette mit Einmalspitzen (100 µl)
- Aqua dest.
- Timer

## 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Die original verschlossenen Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum haltbar, wenn sie bei +2...+8°C im Dunkeln gelagert werden.

Geöffnete Reagenzien sind bei +2...+8°C 60 Tage haltbar.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

*Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (22...28°C) zu bringen!*

### 6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit Streptavidin beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. Den Aluminiumbeutel nur öffnen, wenn er Raumtemperatur hat. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Die Klebefolie nicht von den unbenutzten Streifen entfernen.*

### 6.2. Konjugat

Das Konjugat ist gebrauchsfertig.

### 6.3. CEA Standards

Die Standards sind gebrauchsfertig.

### 6.4. TMB Substratlösung

Das Fläschchen enthält 12 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten*

### 6.5. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 12 ml 0.15 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren.

### 6.6. Waschlösung

Verdünne die konzentrierte Waschlösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml. Für kleinere Volumina das 1:50 Verhältnis beachten. Die verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C 30 Tage haltbar.

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

Als Probenmaterial muss humanes Serum verwendet werden, das unter Beachtung der üblichen Vorsichtsmaßnahmen gewonnen wurde.

Für einen genauen Vergleich mit den etablierten Normalwerten ist es wichtig, dass der Patient bei der morgendlichen Probennahme nüchtern ist.

Das Blut sollte durch Punktion einer Vene in einem einfachen Probengefäß mit rotem Deckel ohne Zusatz von Additiven oder anti-Koagulantien gewonnen werden. Das Blut gerinnen lassen. Abtrennung der Zellen vom Serum durch Zentrifugation.

Die Proben können bei 2...8°C für maximal 5 Tage im Kühlschrank gelagert werden. Falls eine Bearbeitung in dieser Zeit nicht möglich ist, können die Proben bei -20°C für bis zu 30 Tage gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Patientenproben mit CEA Konzentrationen über 250 ng/ml können mit dem Standard 0 verdünnt und erneut gemessen werden.

Bei Doppelbestimmung werden 0,050 ml Probe benötigt.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen. Das Pipettieren der Proben sollte maximal 10 Minuten dauern um einen Drift innerhalb des Testes zu vermeiden. Wenn mehr als eine Mikrotiterplatte gemessen wird, wird empfohlen für jede Platte eine Standardkurve zu erstellen.

1 Vertiefung	(z.B. A1)	Blank
2 Vertiefungen	(z.B. B1+C1)	für Standard 0
2 Vertiefungen	(z.B. D1+E1)	für Standard 1
2 Vertiefungen	(z.B. F1+G1)	für Standard 2
2 Vertiefungen	(z.B. H1+A2)	für Standard 3
2 Vertiefungen	(z.B. B2+C2)	für Standard 4
2 Vertiefungen	(z.B. D2+E2)	für Standard 5

*Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.*

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Dispensiere 25 µl Standards und Proben (und Kontrollen) in die entsprechenden Vertiefungen.
2. Dispensiere 100 µl Konjugat in jede Vertiefung. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken..
3. **Inkubiere für 60 min bei Raumtemperatur (22 – 28°C) .**
4. Nach der Inkubation die Folie entfernen und den Inhalt der Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken. Absaugen und jede Vertiefung dreimal mit 300µl verdünnter Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.  
*Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*
5. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
6. **Inkubiere für 15 min bei Raumtemperatur (22 – 28°C) im Dunkeln.**
7. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
8. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

## 9. QUALITÄTSKONTROLLE

---

Jedes Labor sollte Kontrollen im normalen, hohen und niedrigen Bereich für CEA messen, um die Leistungsfähigkeit des Testes zu überprüfen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und bei jedem Testlauf mitbestimmt werden. Qualitätskontrollaufzeichnungen sollten geführt werden, um die Performance der gelieferten Reagenzien zu überwachen. Um Trends erkennen zu können, sollten angemessene statistische Methoden etabliert werden. Jedes Labor sollte Annahmekriterien für die Testperformance aufstellen. Andere Parameter, die überwacht werden sollten, schließen den 80, 50 und 20% Abschnitt der Standardkurve für die Interassay Reproduzierbarkeit ein. Zusätzlich sollte die maximale Absorption mit früheren Messungen konsistent sein. Signifikante Abweichungen von der etablierten Leistungsfähigkeit können ein Indikator sein für unbemerkte Veränderungen der experimentellen Bedingungen oder Instabilität von Kitreagenzien. Um die Ursache der Abweichung zu ermitteln sollten frische Reagenzien verwendet werden. Wenn Computer-gestützte Datenverarbeitung für die Berechnung der Ergebnisse benutzt wird, ist es zwingend das der erwartete Wert für die Standards innerhalb von 10% der angegebenen Konzentration liegt.

## 10. ERGEBNISSE

---

### 10.1. Hinweis

Die optische Dichte (OD) von einigen Standards und Proben könnte oberhalb von 2,0 liegen, wodurch sie außerhalb des messbaren Bereiches des Mikrotiterplatten Readers liegen könnten. Daher ist es für ODs > 2,0 notwendig eine Messung bei 405 nm (= Wellenlänge der Peakschulter) zusätzlich zu der Messung bei 450 nm (Peak-Wellenlänge) und 620 nm (Referenzfilter für die Subtraktion von plastikabhängigen Interferenzen) durchzuführen.

Für Mikrotiterplatten-Photometer die nicht drei Wellenlängen gleichzeitig messen können, wird empfohlen wie folgt zu verfahren:

- Messe die Mikrotiterplatte bei 450 nm und 620 nm.
  - Messe die Mikrotiterplatte erneut bei 405 nm und 620 nm.
  - Ermittle die Vertiefungen die bei 450 nm eine OD > 2,0 zeigen
  - Wählen Sie das entsprechende Ergebnis bei 405 nm aus und multiplizieren Sie den Wert mit dem Konversionsfaktor 3,0 (wobei  $OD_{450}/OD_{405} = 3,0$ ), d. h.:  $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3,0$ .
- Warnung: Der Konversionsfaktor 3,0 ist nur eine Anhaltspunkt. Für mehr Genauigkeit wird empfohlen den Konversionsfaktor des jeweiligen Gerätes zu berechnen.

Die OD von Standard 5 sollte  $\geq 1.3$  sein.

### 10.2. Berechnung der Ergebnisse

Berechne den Mittelwert der Absorption jedes Punktes der Standardkurve und jeder Probe. Verwende vorzugsweise den 4 Parameter Fit oder die cubic spline Funktion als Auswertalgorithmus.

Interpoliere die Werte der Proben anhand der Standardkurve, um die zugehörige Konzentration in ng/ml zu erhalten.

### 10.3. Referenzwerte

Nichtraucher < 5 ng/ml  
Raucher < 10 ng/ml

## 11. TESTMERKMALE

---

### 11.1. Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare Konzentration an CEA, die vom Standard 0 unterschieden werden kann ist 0,11 ng/ml bei einem 95% Konfidenzintervall.

### 11.2. Spezifität

Um die Spezifität der im Test verwendeten Antikörper zu bestimmen, wurde ein Pool von Patientenproben mit hohen Dosen verwandter Analyte versetzt.

Analyt	Konzentration	Kreuzreaktivität
CEA		100 %
$\beta$ -HCG	250 ng/mL	ND
AFP	5000 ng/mL	ND
CA-125	1000 U/mL	ND
PSA	1000 ng/mL	ND
CA 19-9	1000 U/mL	ND

### 11.3. Präzision

#### Intraassay-Varianz

Die Variation innerhalb eines Testlaufs wurde ermittelt durch die wiederholte Bestimmung (16x) von drei verschiedenen Kontrollseren in einem Test. Die Intraassay-Varianz beträgt  $\leq 5,8\%$ .

#### Interassay-Varianz

Die Variation zwischen verschiedenen Testläufen wurde ermittelt durch die wiederholte Bestimmung (20x) von drei verschiedenen Kontrollseren in verschiedenen Lots. Die Interassay-Varianz beträgt  $\leq 9,9\%$ .

### 11.4. Korrelation mit RIA

Der NovaTec CEA ELISA wurde verglichen mit einem anderen kommerziell erhältlichen CEA Test. 167 Serumproben wurden in beiden Systemen gemessen. Die lineare Regressionskurve wurde berechnet.

$$y = 1.019 \cdot x - 0.200$$

$$r^2 = 0.992$$

y = CEA Predicate Kit

x = CEA NovaTec Kit

### 11.4. Genauigkeit

Die Wiederfindung von 10 – 20 – 40 ng/ml zugegebenem CEA ergab einen durchschnittlichen Wert ( $\pm$ SD) von  $100,7\% \pm 7,2\%$  im Verhältnis zur Originalkonzentration.

## 12. GRENZEN DES VERFAHRENS

---

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

CEA hat eine geringe Sensitivität und Spezifität als Tumormarker. Klinisch erhöhte CEA Werte allein reichen für eine Diagnose nicht aus. Die Diagnose einer Tumorerkrankung darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Es gibt Patienten mit kolorektalem Krebs ohne erhöhte CEA Werte und erhöhte CEA Werte verändern sich nicht immer mit dem Fortschreiten oder Zurückgehen der Erkrankung. Raucher haben eine höhere Basislinie als Nichtraucher.

## 13. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

---

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Das Pipettieren der Reagenzien erfordert maximale Präzision.
- Keine stark hämolytischen oder lipämischen Proben verwenden.
- TMB Substrat keinem direkten Sonnenlicht, Metall oder Oxidantien aussetzen.
- Den Kontakt mit Reagenzien, die Wasserstoffperoxid, Schwefelsäure und Konservierungsmittel enthalten, die beim Verschlucken toxisch sein können, vermeiden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

<b>WARNUNG:</b> Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
--

### **13.1. Entsorgungshinweise**

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

### **14. BESTELLINFORMATION**

---

Produktnummer:

DNOV060

CEA (96 Bestimmungen)





## **BIBLIOGRAPHY/ LITERATUR**

---

- Gold P, Freedman SO, J Exp Med , 121, 439 (1965)  
Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)  
Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)  
Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994) p444  
Sorokin JJ, et al JAMA 228:49-53 (1974)  
Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)  
Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)  
Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)  
Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)  
Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)  
Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)  
Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)  
Ann.Inter.Med.1981;94: 407-409

# SCHEME OF THE ASSAY

CEA

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

	Blank	Standard 0 - 5	Sample
Standard 0 - 5	-	25 µl	-
Sample	-	-	25 µl
Conjugate	-	100 µl	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 60 min at room temperature (22 - 28 °C)</b> Wash each well <b>three times</b> with <b>300 µl</b> diluted Wash Solution			
TMB	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>			
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm			

## NovaTec Immundiagnostica GmbH

### Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6  
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : [info@NovaTec-ID.com](mailto:info@NovaTec-ID.com)

Internet: [www.NovaTec-ID.com](http://www.NovaTec-ID.com)

DNOV060engl, dt-04042011-CR