

# ElAgen CEA kit

REF LI4022F1

$\Sigma$  96 tests







**Adaltis Italia S.p.A.**  
Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy  
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
[www.adaltis.com](http://www.adaltis.com)

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY 

Store at 2...8 °C

en

## SYMBOLS USED ON LABELS

<b>MTPLATE</b>	Microplate
<b>CONJ HRP</b>	HRP Conjugate
<b>CAL0</b>	Calibrator 0
<b>CAL1</b>	Calibrator 1
<b>CAL2</b>	Calibrator 2
<b>CAL3</b>	Calibrator 3
<b>CAL4</b>	Calibrator 4
<b>CAL5</b>	Calibrator 5
<b>SUBS TMB</b>	TMB substrate
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution
<b>WASH BUF 50X</b>	Washing buffer concentrate
<b>LOT</b>	Lot number
<b>REF</b>	Catalogue Code
	Expiry date (Use by...)
 2°C 8°C	Temperature limitation (store at 2...8°C)
$\Sigma$	Number of tests
	Keep away from sunlight
	Manufactured by
	Attention, See Instructions For Use
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device (In vitro diagnostic use)
	Biological risks (see SECTION 7)- Warnings and Precautions).

### 1.0 INTENDED USE

ElAgen CEA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA) in human serum.

### 2.0 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein with a molecular weight of 180 kDa. CEA is the first of the so-called carcinoembryonic proteins that was discovered in 1965 by Gold and Freeman (1).

CEA is the most widely used marker for gastrointestinal cancer. Although CEA is primarily associated with colorectal cancers, other malignancies that can cause elevated levels of CEA include breast, lung, stomach, pancreas, ovary and other organs. Benign conditions that cause significantly higher than normal levels include inflammation of lung and gastrointestinal (GI) tract and benign liver cancer (2,3).

Heavy Smokers, as a group, have higher than normal baseline concentration of CEA.

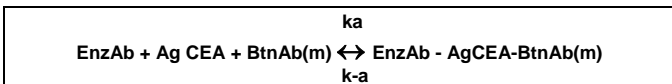
### 3.0 PRINCIPLE OF THE TEST

#### Immunoenzymometric assay:

In this method, calibrators, patient specimens and/or controls (containing the native CEA antigen) are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies are then added and the reactants mixed: these antibodies 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 steric 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)

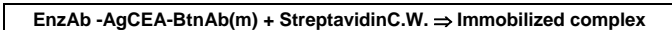
**EnzAb** = Enzyme labeled Antibody (Excess Quantity)

**EnzAb - AgCEA - BtnAb(m)** = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

**k<sub>a</sub>** = Rate Constant of Association

**k<sub>-a</sub>** = Rate Constant of Dissociation

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



**StreptavidinC.W.** = Streptavidin immobilized on well

**Immobilized complex** = sandwich complex bound to the well

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantitated by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

### 4.0 CONTENT OF THE KIT

#### 4.1 MICROPLATE (code 66PIA)

1 microplate of 12 strips x 8 wells coated with Streptavidin. and packaged in aluminium bag with a drying agent.  
Store at 2-8°C.

#### 4.2 CALIBRATORS

6 vials of 1ml each containing serum calibrators for CEA in human serum. Preservative has been added.

Ready to Use

Store at 2-8°C.

Calibrator	symbol	code	Concentration ng/ml	Concentration (mIU/ml)
Calibrator 0	<b>CAL0</b>	66CAL0	0 ng/ml	0 mIU/ml
Calibrator 1	<b>CAL1</b>	66CAL1	5 ng /ml	50 mIU/ml
Calibrator 2	<b>CAL2</b>	66CAL2	10 ng /ml	100 mIU/ml
Calibrator 3	<b>CAL3</b>	66CAL3	25 ng /ml	250 mIU/ml
Calibrator 4	<b>CAL4</b>	66CAL4	50 ng /ml	500 mIU/ml
Calibrator 5	<b>CAL5</b>	66CAL5	250 ng /ml	2500 mIU/ml
1 ng/ml = 10 mIU/ml (1 <sup>st</sup> IRP 73/601)				

**Note:** The calibrators standards, human serum based, were calibrated using a reference preparation, which was assayed against the 1st International Reference Preparation (IRP# 73/601).

#### 4.3 CONJUGATE (code 66HRP)

CONJ|HRP

1 vial (13 mL) containing affinity purified antibody anti-CEA conjugated to HRP and biotinylated monoclonal IgG antibody (mouse) to CEA in buffer with dye and preservative.

Ready to use.

Store at 2-8°C.

#### 4.4 SUBSTRATE HS (LS.TMB-H2O2.HK)

SUBS|TMB

1 vial (13 mL) containing a stabilized mixture of TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide). Cap label: blue.

Ready to use.

Store at 2-8°C.

#### 4.5 STOP SOLUTION (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 vial (13 mL) of 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cap label: red.

Ready to use.

Store at 2-8°C.

*The MSDS is available upon request of laboratory personnel.*

#### 4.6 WASHING BUFFER: (code TLAVM)(50X)

WASH|BUF|50X

1 bottle (20ml) of concentrated washing solution, containing a surfactant in phosphate buffered saline. A preservative has been added.

**Preparation of Wash Buffer working solution:** dilute contents of wash buffer concentrate 50x to 1000 mL with distilled or deionised water in a suitable storage container

**STORAGE** store at room temperature (20-27°C). Stable for up to 60 days.

#### 5.0 STORAGE AND STABILITY AFTER THE FIRST OPENING

- kit components should be stored at 2-8°C and should not be used after the expiry date.
- opened reagents are stable for 60 days when stored at 2-8°C.

#### 6.0 MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Distilled or deionized water and a clean one litre cylinder for the dilution of washing buffer.
- Pipette capable of delivering 25µl volumes with a precision of better than 1.5%.
- Dispenser(s) for repetitive deliveries of 0.100ml and 0.300ml volumes with a precision of better than 1.5%.
- Microplate automatic washer or a squeeze bottle (optional).
- Microplate Reader with 450nm, 405 nm and 620nm wavelength OD capability.
- Absorbent Paper for blotting the microplate wells.
- Plastic wrap or microplate cover for incubation steps.
- Vacuum aspirator (optional) for wash steps.
- Timer.
- Quality control materials.

#### 7.0 WARNINGS OR PRECAUTIONS

##### 7.1 SAFETY PRECAUTION

- The kit is for in vitro diagnostic use only.
- Not for Internal or External Use in Humans or Animals
- All products that contain human serum have been found to be non reactive for Hepatitis B Surface Antigen, HIV 1&2 and HCV Antibodies by FDA required tests. Since no known test can offer complete assurance that infectious agents are absent, all human serum products should be handled as potentially hazardous and capable of transmitting disease.
- Follow Good laboratory procedures for handling blood products.
- Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, sulphuric and preservatives which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth.
- Follow all local, state and national regulations for disposal of all waste material.

##### 7.2 TECHNICAL PRECAUTION

- Avoid exposing TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagent to direct sun-light, metal or oxidants.
- Avoid microbial contamination of reagents.
- The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in the package insert.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results.
- Pipetting of samples should not extend beyond 10 minutes to avoid assay drift.
- If more than 1 plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve.
- Addition of the substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the addition of the substrate and the stopping solution should be added in the same sequence to eliminate any time-deviation during reaction.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

- Failure to remove adhering solution adequately in the aspiration or decantation wash step(s) may result in poor replication and spurious results.
- Use components from the same lot. No intermixing of reagents from different batches.

#### 8.0 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

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

#### 9.0 ASSAY PROCEDURE

##### 9.1 PREPARATION FOR ASSAY

- Bring all reagents to room temperature (20-27°C).
- Format the microplate wells for each calibrator, control and patient specimen to be assayed in duplicate. Replace any unused microwell strips back into the aluminum bag, seal and store at 2-8°C.

##### 9.2 PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- A. Pipette** 25µl of the appropriate calibrator, control or specimen into the assigned wells
- B. Pipette** 100 µl of Conjugate into the wells;
- C. Swirl** the microplate gently for 20-30 seconds to mix and the **cover**.
- D. Incubate** at room temperature for **60 minutes**.
- E. Discard** the content of the microplate by aspiration or decantation. If decanting, blot the plate dry with absorbent paper;
- F. Wash** wells adding 300 µl of washing buffer working solution (see 4.6), then aspirate (or decant, tap and blot); Repeat 2 additional times for a total of 3 washes.
- An automatic or manual plate washer can be used. Follow the manufacturer's instruction for proper usage.*
- If a squeeze bottle is employed, fill each well by depressing the container (avoiding air bubbles) to dispense the wash. Decant the wash and repeat 2 additional times.*
- G. Add** 100µl of Substrate HS to each well.
- H. Incubate** the wells at room temperature for **15 minutes**.
- I. Add** 100 µl of Stop Solution in the same sequence and timing adopted to dispense the Substrate HS
- J. Read** at 450 and 405 nm with the reference filter set at 620 nm within 30 minutes.

#### 10.0 CALCULATION OF RESULTS

##### 10.1 VALIDITY OF THE ASSAY

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

##### 10.2 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the low, medium and high ranges of the dose response curve 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. 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.

##### 10.3 OD CONVERSION

The optical densities (O.D.s) of some calibrators 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.

**10.4 DATA REDUCTION - AUTOMATED METHOD**

Use the 4 parameters logistic – preferred – or the smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

**NOTE:** 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.

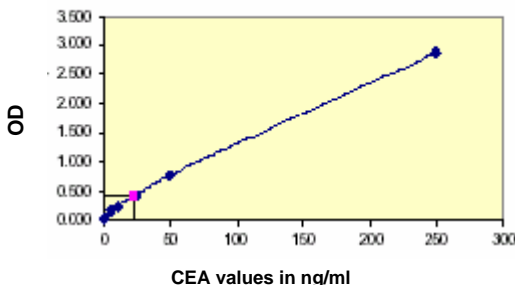
**10.5 DATA REDUCTION: MANUAL METHOD**

A dose response curve is used to ascertain the concentration of CEA in unknown specimens.

- Record the OD obtained from the printout of the microplate reader as outlined in Example 1.
- Plot the OD for each duplicate calibrator versus the corresponding CEA concentration in ng/ml on linear graph paper (do not average the duplicates of the calibrators before plotting).
- Draw the best-fit curve through the plotted points.
- To determine the concentration of CEA for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in ng/ml) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated). In the following example, the average OD (0.391) intersects the dose response curve at (22.5ng/ml) CEA concentration (See Figure 1).

EXAMPLE 1				
Sample ID	Well number	OD	Mean OD	Value ng/ml
CAL 0	A1	0.017	0.018	0
	B1	0.019		
CAL 1	C1	0.160	0.159	5
	D1	0.159		
CAL 2	E1	0.231	0.227	10
	F1	0.224		
CAL 3	G1	0.431	0.424	25
	H1	0.418		
CAL 4	A2	1.776	1.770	50
	B2	1.763		
CAL 5	C2	2.851	2.866	250
	D2	2.880		
patient	E2	0.389	0.391	22.5
	F2	0.384		

Figure 1



The data presented in Example 1 and Figure 1 are for illustration only and should not be used in lieu of a dose response curve prepared with each assay.

**10.6 MEASUREMENT RANGE**

Patient specimens with CEA concentrations above 250 ng/ml may be diluted (for example 1/10 or higher) with normal male serum (CEA < 5 ng/ml) and re-assayed. The sample's concentration is obtained by multiplying the result by the dilution factor (10).

**11.0 EXPECTED VALUES**

Nearly 99% of non-smokers have CEA concentrations less than 5ng/ml. Similarly 99% of smokers have concentrations less than 10ng/ml (4).

TABLE I Expected Values for EIAGEN CEA kit	
Non-smokers	<5ng/ml
Smokers	<10ng/ml

It is important to keep in mind that establishment of a range of values which can be expected to be found by a given method for a population of "normal"-persons is dependent upon a multiplicity of factors: the specificity of the method, the population tested and the precision of the method in the hands of the analyst. For these reasons each laboratory should depend upon the range of expected values established by the Manufacturer only until an in-house range can be determined by the analysts using the method with a population indigenous to the area in which the laboratory is located.

**12.0 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

- Sample(s), which are contaminated microbiologically, should not be used in the assay. Highly lipemic or hemolysed specimen(s) should similarly not be used.
- CEA has a low clinical sensitivity and specificity as a tumor 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.

**13.0 PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**13.1 PRECISION**

The within and between assay precision of the EIAGEN CEA kit were determined by analyses on three different levels of control sera. The number, mean value, standard deviation (SD) and coefficient of variation for each of these control sera are presented in Table 3 and Table 4.

TABLE 2 Within Assay Precision (Values in ng/ml)				
Sample	N	MEAN	SD	C.V.
Level 1	20	4.8	0.35	7.3%
Level 2	20	21.7	1.35	6.2%
Level 3	20	60.5	3.58	5.9%

TABLE 3 Between Assay Precision* (Values in ng/ml)				
Sample	N	MEAN	SD	C.V.
Level 1	10	5.0	0.41	8.2%
Level 2	10	21.2	1.25	5.9%
Level 3	10	59.5	3.15	5.3%

\*As measured in ten experiments in duplicate

**13.2 ACCURACY-METHOD COMPARISON**

The EIAGEN CEA kit was compared with a reference Elisa method. Biological specimens from normal, and elevated concentrations were assayed. The total number of such specimens was 202. The least square regression equation and the correlation coefficient were computed for the EIAGEN CEA kit in comparison with the reference method. The data obtained is displayed in Table 4.

TABLE 4			
Method	Mean	Least Square Regression Analysis	Correlation Coefficient
EIAGEN CEA kit	5.67	y = -0.1164+1.0324(X)	0.998
Reference method	5.75		

**13.3 SENSITIVITY**

The EIAGEN CEA kit has a sensitivity of 0.025 ng. This is equivalent to a sample containing 1 ng/ml CEA concentration.

**13.4 SPECIFICITY**

Highly specific antibodies to CEA molecules have been used in the EIAGEN CEA kit. No interference was detected with the performance of EIAGEN CEA kit upon addition of massive amounts of the following substances to a human serum pool.

Acetylsalicylic Acid	100 µg/ml
Ascorbic Acid	100 µg/ml
Caffeine	100 µg/ml
AFP	10 µg/ml
PSA	1.0 µg/ml
CA-125	10,000 U/ml
hCG	1000 IU/ml
hLH	10 IU/ml
hTSH	100 mIU/ml
hPRL	100 µg/ml

**13.5 LINEARITY & HOOK EFFECT**

Three different lot preparations of the EIAGEN CEA kit reagents were used to assess the linearity and hook effect. Massive concentrations of CEA (> 60,000 ng/ml) were used for linear dilutions in pooled human patient sera. The test showed no hook effect up to concentrations of 60,000 ng/ml and a within dose recovery of 92.0 to 111.4%.

**14.0 AUTOMATION**

Application protocols for the proper automation on the Adaltis microtiterstrips analyzers (Labotech, Personal Lab and Nexgen) are available upon request at Adaltis directly.

## 15.0 SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors .


ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different ( $\pm$ 50%) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>- incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation)</li> <li>- error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>- contamination of Substrate or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> </ul>
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes)</li> <li>- error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments)</li> <li>- contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)</li> <li>- pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)</li> </ul>
no colourimetric reaction after addition of substrate	<ul style="list-style-type: none"> <li>- some reagent not pipetted</li> <li>- strong contamination of Conjugate or Substrate</li> <li>- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)</li> </ul>
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation time too short, incubation temperature too low</li> </ul>
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation time too long, incubation temperature too high</li> <li>- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)</li> <li>- insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contamination of pipettes, tips or containers</li> <li>- inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)</li> </ul>
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temp. prior to use</li> <li>- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)</li> </ul>
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation conditions not constant (time, temperature)</li> <li>- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)</li> <li>- person-related variation</li> </ul>

## 15.0 REFERENCES

1. Gold P, Freedman SO, *J Exp Med*, **121**, 439 (1965).
2. Zamcheck N, *Adv Intern Med*, **19**, 413 (1974).
3. Rayncao G, Chu TM, *JAMA*, **220**, 381 (1972).
4. Wild D, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press (1994) p444.
5. Sorokin JJ, Sugarbaker PH, Zamcheck N, Pisick M, Kupchik HZ, Moore FD. "Serial carcinoembryonic antigen assays. Use in detection of cancer recurrence." *JAMA* 1974;228:49-53.
6. Mackay AM, Patel S, Carter S, Stecens U, Lawrence DJR, Cooper EH, et al. "Role of serial plasma assays in detection of recurrent and metastatic colorectal carcinomas." *Br. Med. J.* 1974; 4:382-385.
7. Sikorska H, Schuster J, Gold P. "Clinical applications of carcinoembryonic antigen." *Cancer Detection Preview* 1988; 12:321-355.
8. Minton JP, Martin EW Jr. "The use of serial CEA determinations to predict recurrence of colon cancer and when to do a secondlook surgery." *Cancer* 1978;42:1422-27.
9. Staab HJ, Anderer FA, Stumpf E, Fischer R. "Slope analysis of the postoperative CEA time course and its possible application as an aid in diagnosis of disease progression in gastrointestinal carcinoma." *Am. J.Surgery* 1978;136:322-327.
10. Thomas P, Toth CA, Saini KS, Jesup JM, Steele G. Jr., "The structure, metabolism and function of carcinoembryonic antigen gene family." *Biochem Biophys Acta* 1990;1032:177-189.
11. Yamashita K, Totami K, Kuroki M, Ueda I, Kobata A. "Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens." *Cancer Research* 1987;47:3451-3459.
12. Hammerstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larson A, Ghosh R, et al. "Antigenic sites in carcinoembryonic antigen." *Cancer Research* 1989;49:4852-58.
13. National Institute of Health. Carcinoembryonic Antigen: Its role as a marker in the management of cancer. A national Institute of Health Consensus Development Conference. *Ann.Intern.Med.*1981;94:407-409.

# EIAgen CEA kit

REF LI4022F1

 96 tests

**Adaltis Italia S.p.A.**  
Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy  
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
[www.adaltis.com](http://www.adaltis.com)








**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**



Conservare a 2...8 °C

it

## SIMBOLI UTILIZZATI SULL'ETICHETTA

<b>MTPLATE</b>	Micropiastra
<b>CONJ HRP</b>	Coniugato HRP
<b>CAL0</b>	Calibratore 0
<b>CAL1</b>	Calibratore 1
<b>CAL2</b>	Calibratore 2
<b>CAL3</b>	Calibratore 3
<b>CAL4</b>	Calibratore 4
<b>CAL5</b>	Calibratore 5
<b>SUBS TMB</b>	Substrato TMB
<b>SOLN STOP</b>	Soluzione bloccante
<b>WASH BUF 50X</b>	Tampone di lavaggio concentrato
<b>LOT</b>	Numero di lotto
<b>REF</b>	Codice catalogo
	Data di scadenza (Usare entro...)
 2°C 8°C	Limitazioni di temperatura (conservare a 2...8°C)
	Numero di tests
	Proteggere dalla luce solare
	Fabbricato da
	Attenzione, leggere le Istruzioni per l'Uso
<b>IVD</b>	Dispositivo diagnostico in vitro (solo per uso diagnostico in vitro)
	Rischio Biologico (vedere sezione 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI)

## 1.0 FINALITA' D'USO

Il kit EIAgen CEA è un metodo immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'antigene Carcinoembrigenico (CEA) nel siero umano.

## 2.0 INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'antigene Carcinoembrigenico (CEA) è una glicoproteina con un peso molecolare di 180 kDA. E' stata la prima fra le cosiddette proteine carcinoembrigeniche scoperte nel 1965 da Gold e Freeman (1).

Il CEA è il marcatore più largamente utilizzato per diagnosticare il cancro del tratto gastro-intestinale. Sebbene il CEA sia associato innanzitutto con i tumori colon-rettali, fra le altre neoplasie causate dal CEA sono incluse il tumore al seno, ai polmoni, allo stomaco, al pancreas, alle ovaie e ad altri organi. Fra le condizioni benigne, l'innalzamento sensibile dei valori rispetto alla norma può essere causato da infiammazioni polmonari e del tratto gastrointestinale (GI) e dal tumore benigno del fegato (2,3).

I fumatori accaniti presentano una concentrazione di CEA più elevate della norma.

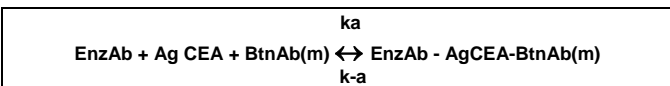
## 3.0 PRINCIPIO DEL TEST

### Saggio immunoenzimatico:

Nel presente metodo i calibratori, i campioni dei pazienti e/o i controlli (contenenti l'antigene CEA nativo) sono aggiunti ai pozzetti della micropiastra sensibilizzati con la streptavidina. Successivamente, vengono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti-CEA monoclonali biotinilati, sia anticorpi coniugati all'enzima, e i reagenti vengono mescolati: entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi di CEA.

Nei pozzetti della micropiastra, la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



**BtnAb(m)** = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

**AgCEA** = Antigene Nativo (Quantità Variabile)

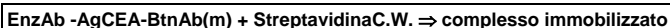
**EnzAb** = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

**EnzAb -AgCEA -BtnAb(m)** = Complesso Sandwich Antigene-Anticorpi

**k<sub>a</sub>** = Costante di Associazione

**k<sub>-a</sub>** = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:



**Streptavidina C.W.** = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

**Complesso immobilizzato** = Legame sandwich Anticorpo-Antigene legato alla superficie

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata all'anticorpo si separa dall'antigene non reagito mediante decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

L'attività dell'enzima è quantificata mediante la reazione con un substrato che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene

## 4.0 CONTENUTO DEL KIT

### 4.1 MICROPIASTRA (codice 66PIA)

**MTPLATE**

1 micropiastra di 12 pozzetti x 8 sensibilizzati con Streptavidina e sigillati in una busta di alluminio in presenza di un essiccante.

Conservare a 2-8°C.

### 4.2 CALIBRATORI

6 flaconi da 1ml ciascuno contenenti calibratori per l'antigene CEA in base sierica, con l'aggiunta di un conservante.

Pronto all'uso.

Conservare a 2-8°C

Calibratore	simbolo	codice	Concentrazione ng/ml	Concentrazione (mIU/ml)
Calibratore 0	CAL0	66CAL0	0 ng/ml	0 mIU/ml
Calibratore 1	CAL1	66CAL1	5 ng /ml	50 mIU/ml
Calibratore 2	CAL2	66CAL2	10 ng /ml	100 mIU/ml
Calibratore 3	CAL3	66CAL3	25 ng /ml	250 mIU/ml
Calibratore 4	CAL4	66CAL4	50 ng /ml	500 mIU/ml
Calibratore 5	CAL5	66CAL5	250 ng /ml	2500 mIU/ml
1 ng/ml = 10 mIU/ml (1 <sup>st</sup> IRP 73/601)				

**Note:** I calibratori in base sierica umana sono stati calibrati utilizzando una preparazione di riferimento, che è stata testata contro 1<sup>st</sup> International Reference Preparation (IRP# 73/601).

#### 4.3 CONIUGATO (codice 66HRP)

CONJ|HRP

1 flacone (13 mL) contenente sia anticorpi anti-CEA coniugati ad HRP, sia anticorpi anti-CEA IgG monoclonali (murini) biotinilati, in tampone, con colorante e conservanti.

Pronto all'uso.

Conservare a 2-8°C.

#### 4.4 SUBSTRATO HS (LS.TMB-H2O2.HK)

SUBS|TMB

1 flacone (13 mL) contenente una soluzione stabilizzata di TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (perossido di idrogeno). Tappo blu.

Pronto all'uso.

Conservare a 2-8°C.

#### 4.5 SOLUZIONE BLOCCANTE (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 flacone (13 ml) di 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tappo rosso.

Pronto all'uso.

Conservare a 2-8°C.

**La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta dell'utilizzatore professionale**

#### 4.6 SOLUZIONE DI LAVAGGIO 50x (code TLAVM)

WASH|BUF|50X

1 flacone (20ml) di soluzione di lavaggio concentrata, contenente tensioattivi in tampone salino fosfato. E' stato aggiunto un conservante.

**Preparazione della soluzione di lavaggio diluita:** diluire il contenuto del flacone della soluzione di lavaggio concentrata 50x fino a 1000 mL con acqua distillata o deionizzata, in un contenitore adatto alla conservazione.

**CONSERVAZIONE:** conservare a temperatura ambiente (20-27°C); stabile fino a 60 giorni.

#### 5.0 CONSERVAZIONE E STABILITA' DOPO LA PRIMA APERTURA

- I componenti del kit devono essere conservati a 2...8°C e non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.
- I reagenti una volta aperti sono stabili per 60 giorni se conservati a 2...8°C.

#### 6.0 MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI NON FORNITI NEL KIT

- Acqua distillata o deionizzata e un cilindro pulito da 1 litro per la diluizione della soluzione di lavaggio.
- Pipette per dispensare volumi di 25 µl con una precisione migliore dell'1,5%.
- Pipette sequenziali per dispensare volumi di 0.100ml e 0.300ml con una precisione migliore dell'1,5%.
- Lavatore automatico di micropiastra o bottiglia a spruzzo (opzionale).
- Fotometro per micropiastra in grado di leggere le OD con assorbanze da 450nm, 405 nm e 620nm.
- Carta assorbente per asciugare i pozzetti della micropiastra.
- Pellicola in plastica per coprire le micropiastre durante l'incubazione.
- Aspiratore (opzionale) per le fasi di lavaggio.
- Timer.
- Materiali per il controllo di qualità

#### 7.0 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

##### 7.1 PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Il kit è solo per uso diagnostico in vitro
- Il kit non è inteso per un uso interno né esterno, né in persone né in animali
- Tutti i prodotti contenenti siero umano sono risultati negativi per la presenza dell'antigene di superficie dell'Epatite B, degli anticorpi dell'HIV 1&2 e dell'HCV. Tutti i materiali sono stati analizzati con saggi approvati dall'FDA. Tuttavia, dal momento che nessun metodo può offrire completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, tutti i prodotti contenenti siero umano devono essere manipolati come agenti potenzialmente pericolosi e capaci di trasmettere malattie
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio nella manipolazione di derivati del sangue.
- Evitare il contatto con reagenti che contengono perossido di idrogeno, acido solforico e conservanti che possono essere tossici se ingeriti. Non pipettare con la bocca.
- Eseguire lo smaltimento dei rifiuti seguendo le leggi vigenti.

#### 7.2 PRECAUZIONI TECNICHE

- Evitare l'esposizione della soluzione TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alla luce diretta, a metalli od ossidanti.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti.
- Le prestazioni qui riportate sono state ottenute impiegando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'Uso.
- E' importante mantenere costanti i tempi delle reazioni in ciascun pozzetto, per ottenere risultati riproducibili.
- Il pipettamento dei campioni non deve durare oltre 10 minuti, per evitare risultati scorretti.
- Nel caso si utilizzasse più di 1 piastra, si consiglia di ripetere la curva dose-risposta.
- L'aggiunta della soluzione di substrato dà inizio a una reazione cinetica, che viene interrotta dall'aggiunta della soluzione bloccante. Pertanto, è necessario aggiungere il substrato e la soluzione bloccante nella medesima sequenza per eliminare qualsiasi variazione dovuta al tempo durante la reazione.
- I lettori di micropiastre misurano in senso verticale. Evitare di toccare il fondo dei pozzetti.
- Una rimozione incompleta della soluzione di incubazione e lavaggio durante le fasi di aspirazione o decantazione rischia di generare risultati spuri o caratterizzati da scarsa riproducibilità dei replicati.
- Usare componenti provenienti dallo stesso lotto. Non mischiare reagenti provenienti da lotti diversi.

#### 8.0 RACCOLTA DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE

- Utilizzare campioni sierici, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.
- Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.
- Il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti.
- Lasciare coagulare il sangue. Centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.
- I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni.
- Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.
- Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0.050 ml dei campioni.

#### 9.0 PROCEDURA DEL TEST

##### 9.1 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Portare i reagenti a temperatura ambiente (20-27°C).
- Calcolare i pozzetti necessari per la determinazione in duplicato per ogni calibratore, controllo e campione. Rimettere i pozzetti inutilizzati nella busta di alluminio, sigillare e conservare a 2-8°C.

##### 9.2 PROCEDURA DI DISPENSAZIONE E INCUBAZIONE

- Dispensare** 25µl degli appropriati calibratori, controlli o campioni nei pozzetti assegnati
- Dispensare** 100µl di coniugato nei pozzetti;
- Agitare** delicatamente la micropiastra per 20-30 secondi e **coprirla**.
- Incubare** a temperatura ambiente per **60 minuti**;
- Eliminare** il contenuto della micropiastra per aspirazione o decantazione. Se viene eliminato per decantazione, tamponare la micropiastra con carta assorbente per asciugarla;
- Lavare** i pozzetti aggiungendo 300µl di soluzione di lavaggio (vedi 4.6), poi aspirare (o decantare, tamponare con carta assorbente per asciugare); ripetere altre 2 volte per un totale di 3 lavaggi.  
*Può essere usato un lavatore per micropiastre automatico o manuale. Seguire le istruzioni del produttore per un uso appropriato.*  
*Se viene usata una bottiglia a spruzzo, riempire bene ogni pozzetto premendo la bottiglia (evitando bolle d'aria) nel dispensare la soluzione di lavaggio. Decantare la soluzione di lavaggio e ripetere ancora 2 volte.*
- Aggiungere** 100µl di Substrato HS in ogni pozzetto.
- Incubare** a temperatura ambiente per **15 minuti**.
- Aggiungere** 100 µl of Soluzione Bloccante nella stessa sequenza e frequenza adottate per dispensare il Substrato HS
- Leggere** a 450 e 405 nm con il filtro di riferimento selezionato a 620 nm entro 30 minuti.

#### 10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

##### 10.1 VALIDITA' DEL SAGGIO

La OD del calibratore 5 deve essere ≥ 1.3.

##### 10.2 CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nel range di basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta.

Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti

forniti.

Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento.

Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

### 10.3 CONVERSIONE DELLE OD

Le densità ottiche (O.D.) di alcuni calibratori e di alcuni campioni potrebbero essere superiori a 2,0, e in tal caso, potrebbero essere fuori dal range di misurazione di alcuni lettori di micropiastre. È necessario in questi casi eseguire anche una lettura a 405 nm (= lunghezza d'onda alla quale si trova la spalla del picco) oltre alla lettura a 450 nm (lunghezza d'onda del picco) e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Se si utilizzano i lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastre a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastre a 405 nm e 620 nm.
- selezionare i pozzetti le cui OD a 450 nm sono più alte di 2,0.
- selezionare le corrispondenti OD a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per fattore di conversione 3,0 (dove OD 450/OD 405 = 3,0), cioè:  $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$

Nota bene: il fattore 3,0 è solamente suggerito. Per migliore accuratezza, gli utilizzatori devono calcolare il fattore di conversione sul proprio lettore.

### 10.4 ELABORAZIONE DEI DATI – METODO AUTOMATICO

Utilizzare i metodi: 4 parametri logistici (di preferenza) o *smoothed cubic spline* come algoritmo di calcolo.

**NOTA:** Se per calcolare i risultati è stato usato un programma di calcolo, è imperativo che i valori calcolati per i calibratori cadano entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

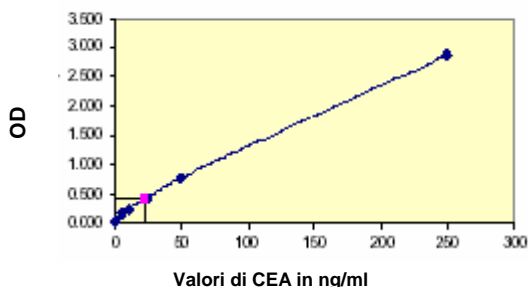
### 10.5 ELABORAZIONE DEI DATI – METODO MANUALE

Una curva dose-risposta viene utilizzata per determinare le concentrazioni dell'antigene Carcinoembrionico in campioni incogniti.

1. Registrare le OD ottenute dalla stampa del lettore di micropiastre come illustrato nell'Esempio 1.
  2. Tracciare su carta millimetrata una curva dose risposta (DRC) utilizzando la OD media per ciascun calibratore in duplicato contro le corrispondenti concentrazioni di CEA in ng/ml.
  3. Tracciare la curva che passa per i punti.
1. Per determinare la concentrazione di CEA per un campione incognito, localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in ng/ml) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato). Nel seguente esempio, è indicata la OD media di (0.391) che interseca la curva standard in corrispondenza della concentrazione di CEA (22.5ng/ml) (Vedere Figura 1).

ESEMPIO 1				
ID Campione	Numero Pozzetto	OD	OD Media	Valore ng/ml
CAL 0	A1	0.017	0.018	0
	B1	0.019		
CAL 1	C1	0.160	0.159	5
	D1	0.159		
CAL 2	E1	0.231	0.227	10
	F1	0.224		
CAL 3	G1	0.431	0.424	25
	H1	0.418		
CAL 4	A2	1.776	1.770	50
	B2	1.763		
CAL 5	C2	2.851	2.866	250
	D2	2.880		
patient	E2	0.389	0.391	22.5
	F2	0.384		

Figura 1



I valori mostrati in Esempio 1 e in Figura 1 sono solo dimostrativi e non devono essere usati in sostituzione della curva standard preparata per ogni prova. I valori assegnati per i calibratori sono specifici di ciascun lotto.

### 10.6 INTERVALLO DI MISURA

Campioni di pazienti con concentrazioni di CEA al di sopra dei 250 ng/ml possono essere diluiti (ad esempio 1/10 o superiori) con siero maschile normale (CEA < 5 ng/ml) e testati di nuovo. La concentrazione dei campioni è stata ottenuta moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione (10).

### 11.0 VALORI ATTESI

Quasi il 99% di non fumatori presentano concentrazioni di CEA inferiori a 5ng/ml. Analogamente, il 99% di fumatori presentano concentrazioni inferiori a 10ng/ml (4).

TABELLA 1 Valori attesi per EIAgen CEA kit	
Non fumatori	<5ng/ml
Fumatori	<10ng/ml

È importante considerare che stabilire un intervallo di valori che ci si attende di poter trovare usando un dato metodo per una data popolazione di persone "normali", dipende da molteplici fattori: la specificità del metodo, la popolazione analizzata e la precisione del metodo che dipende dall'utilizzatore. Per queste ragioni ogni laboratorio dovrebbe riferirsi all'intervallo di valori attesi stabilito dal Produttore solo fino a quando l'utilizzatore non determini un proprio intervallo, ottenuto dosando con questo metodo campioni della popolazione originaria dell'area dove il laboratorio è situato.

### 12.0 LIMITI DELLA PROCEDURA

- Campioni microbiologicamente contaminati non dovrebbero essere utilizzati nel saggio. Analogamente, non utilizzare campioni altamente lipemici o emolizzati.
- Il CEA in quanto marcatore tumorale possiede una sensibilità e una specificità basse. Dal punto di vista clinico, valori di CEA elevati, da soli, non hanno il valore diagnostico di test per accertare il cancro e quindi dovrebbero essere utilizzati sempre insieme ad altre manifestazioni (osservazioni) cliniche e parametri diagnostici. Può succedere che pazienti con cancro colon-rettale non presentino valori elevati di CEA, e valori elevati di CEA non sempre cambiano con la progressione o la regressione del male. I fumatori presentano una più ampia gamma di valori di base rispetto ai non fumatori.

### 13.0 CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

#### 13.1 PRECISIONE

Le precisioni intra- e inter-saggio sono state determinate testando tre diversi livelli per i sieri di controllo. Il numero, il valore medio trovato, la deviazione standard (S.D.) e il coefficiente di variazione (CV %) per ciascuno dei tre controlli sono riportati nelle seguenti tabelle:

TABELLA 2 Precisione Intra-saggio (Valori in ng/ml)				
Campione	N	Media	SD	C.V.
Livello 1	20	4.8	0.35	7.3%
Livello 2	20	21.7	1.35	6.2%
Livello 3	20	60.5	3.58	5.9%

TABELLA 3 Precisione Inter-saggio* (Valori in ng/ml)				
Campione	N	Media	SD	C.V.
Livello 1	10	5.0	0.41	8.2%
Livello 2	10	21.2	1.25	5.9%
Livello 3	10	59.5	3.15	5.3%

\*Come da misura effettuata in 10 esperimenti in duplicato

#### 13.2 ACCURATEZZA – CONFRONTO FRA METODI

Il kit EIAgen CEA è stato confrontato con un metodo di riferimento Elisa. Sono stati testati campioni biologici con concentrazioni normali ed elevate. Il numero totale di tali campioni è stato 202. Sono stati calcolati l'equazione della retta di regressione (metodo dei minimi quadrati) e il coefficiente di correlazione per il test EIAgen CEA in confronto col metodo di riferimento. I dati ottenuti sono illustrati nella Tabella 4.

TABELLA 4			
Metodo	Media	Analisi di regressione dei minimi quadrati	Coefficiente di correlazione
Kit EIAgen CEA	5,67	$y = -0,1164 + 1,0324(X)$	0,998
Metodo di riferimento	5,75		

#### 13.3 SENSIBILITA'

Il kit EIAgen CEA ha una sensibilità di 0,025 ng. Ciò equivale ad un campione avente una concentrazione in CEA di 1 ng/ml.

### 13.4 SPECIFICITÀ

Anticorpi altamente specifici alle molecole di CEA sono stati utilizzati nel kit EIAGEN CEA. Non è stata riscontrata alcuna interferenza con la prestazione del kit EIAGEN CEA dopo l'aggiunta di quantità elevate delle seguenti sostanze a un pool di sieri umani:

Acido Acetilsalicilico	100 µg/ml
Acido Ascorbico	100 µg/ml
Caffeina	100 µg/ml
AFP	10 µg/ml
PSA	1.0 µg/ml
CA-125	10,000 U/ml
hCG	1000 IU/ml
hLH	10 IU/ml
hTSH	100 mIU/ml
hPRL	100 µg/ml

### 13.5 LINEARITÀ ED EFFETTO GANCIO

Sono state utilizzate preparazioni con reagenti provenienti da 3 lotti diversi del kit EIAGEN CEA per determinare la linearità e l'esistenza di un effetto gancio.

Sono state utilizzate concentrazioni molto alte di CEA (> 60.000 ng/ml) per le diluizioni lineari in pool di sieri di pazienti umani.

Il test ha dimostrato che non vi è stato alcun effetto gancio fino a concentrazioni di 60.000 ng/ml, e un recupero da 92.0 a 111.4%.

### 14.0 AUTOMAZIONE

I protocolli applicativi per una corretta automazione sui dispositivi di analisi (Labotech, Personal lab e Nexgen) di micropiastre ADALTIS sono disponibili dietro richiesta direttamente ad ADALTIS.

### 15.0 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione possono evitare i seguenti tipi di errori.

ERRORE	POSSIBILI CAUSE e SUGGERIMENTI
OD molto diverse (± 50%) da quelle riportate nel QC	<ul style="list-style-type: none"> <li>errato volume di dispensazione dei campioni o dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente)</li> <li>errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare all'inizio dell'incubazione)</li> <li>errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti)</li> <li>contaminazione del Substrato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)</li> </ul>
Risultati riproducibili poco	<ul style="list-style-type: none"> <li>volume di dispensazione dei reagenti e campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio, nel caso tararle nuovamente)</li> <li>errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti)</li> <li>contaminazione del substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti)</li> <li>inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimenti: utilizzare puntali appropriati, contenitori per il travaso dei reagenti, monouso adatti e acqua distillata o equivalente)</li> </ul>
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato.	<ul style="list-style-type: none"> <li>alcuni reagenti non sono stati dispensati</li> <li>forte contaminazione del coniugato o del substrato</li> <li>Errata sequenza di esecuzione (es. dispensazione accidentale di reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato)</li> </ul>
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	<ul style="list-style-type: none"> <li>tempo di incubazione troppo breve, temperature di incubazione troppo basse</li> </ul>
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	<ul style="list-style-type: none"> <li>tempo di incubazione troppo lungo o temperatura di incubazione troppo alta</li> <li>qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)</li> <li>lavaggio non efficiente (coniugato non propriamente rimosso)</li> </ul>
Inspiegabili risultati aberranti	<ul style="list-style-type: none"> <li>contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori</li> <li>lavaggio incostante e insufficiente (coniugato non propriamente rimosso)</li> </ul>
CV% intrasaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> <li>reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso</li> <li>il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)</li> </ul>
CV% intersaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> <li>condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperature)</li> <li>controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli; suggerimento: controllare la sequenza di dispensazione)</li> <li>variabilità intrinseca degli operatori</li> </ul>

### 16.0 BIBLIOGRAFIA

- Gold P, Freedman SO, *J Exp Med*, **121**, 439 (1965).
- Zamcheck N, *Adv Intern Med*, **19**, 413 (1974).
- Raynao G, Chu TM, *JAMA*, **220**, 381 (1972).
- Wild D, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press (1994) p444.
- Sorokin JJ, Sugarbaker PH, Zamcheck N, Pisick M, Kupchik HZ, Moore FD. "Serial carcinoembryonic antigen assays. Use in detection of cancer recurrence." *JAMA* 1974;228:49-53.
- Mackay AM, Patel S, Carter S, Stecens U, Lawrence DJR, Cooper EH, et al. "Role of serial plasma assays in detection of recurrent and metastatic colorectal carcinomas." *Br. Med. J.* 1974; 4:382-385.
- Sikorska H, Schuster J, Gold P. "Clinical applications of carcinoembryonic antigen." *Cancer Detection Preview* 1988; 12:321-355.
- Minton JP, Martin EW Jr. "The use of serial CEA determinations to predict recurrence of colon cancer and when to do a secondlook surgery." *Cancer* 1978;42:1422-27.
- Staab HJ, Anderer FA, Stumpf E, Fischer R. "Slope analysis of the postoperative CEA time course and its possible application as an aid in diagnosis of disease progression in gastrointestinal carcinoma." *Am. J.Surgery* 1978;136:322-327.
- Thomas P, Toth CA, Saini KS, Jesup JM, Steele G. Jr., "The structure, metabolism and function of carcinoembryonic antigen gene family." *Biochem Biophys Acta* 1990;1032:177-189.
- Yamashita K, Totami K, Kuroki M, Ueda I, Kobata A. "Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens." *Cancer Research* 1987;47:3451-3459.
- Hammerstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larson A, Ghosh R, et al. "Antigenic sites in carcinoembryonic antigen." *Cancer Research* 1989;49:4852-58.
- National Institute of Health. Carcinoembryonic Antigen: Its role as a marker in the management of cancer. A national Institute of Health Consensus Development Conference. *Ann.Intern.Med.* 1981;94:407-409.

# Kit EIAgen CEA

REF LI4022F1

Σ 96 testes

## Adaltis Italia S.p.A.


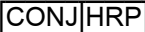






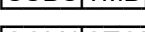
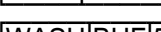
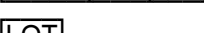











Via Cristoni, 12  
40033 Casalecchio di Reno – (Bologna) Itália  
Tel.: +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280  
[www.adaltis.com](http://www.adaltis.com)

APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO 

Conservar a 2...8°C

Pt

## SÍMBOLOS USADOS NOS RÓTULOS

	Microplaca
	Conjugado HRP
	Calibrador 0
	Calibrador 1
	Calibrador 2
	Calibrador 3
	Calibrador 4
	Calibrador 5
	Substrato TMB
	Solução de paragem
	Tampão de lavagem concentrado
	Número de lote
	Código do catálogo
	Prazo de validade (Usar até...)
 2°C  8°C	Limite de temperatura (conservar a 2...8°C)
	Número de testes
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Fabricado por:
	Atenção, consultar as Instruções de Utilização
	Dispositivo médico de diagnóstico "in vitro" (uso diagnóstico "in vitro")
	Riscos Biológicos (Consultar SECÇÃO 7 – Advertências e Precauções).

### 1.0 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O kit EIAgen CEA é um imunoenensaio enzimático de fase sólida directa, utilizado para medição quantitativa do Antígeno Carcinoembrionário (Carcinoembryonic Antigen - CEA) no soro humano.

### 2.0 RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O antígeno carcinoembrionário é uma glicoproteína com um peso molecular de 180 kilodaltons. CEA é a primeira das chamadas proteínas carcinoembrionárias que foi descoberta em 1965 por Gold e Freeman (1).

CEA é o marcador para o cancro gastrointestinal que é usado de forma mais alargada. Embora o CEA esteja sobretudo associado aos cancros colorectais, as outras malignidades que podem provocar níveis elevados de CEA incluem a mama, o pulmão, o estômago, o pâncreas, o ovário e outros órgãos. As patologias benignas que causam níveis significativamente mais elevados que os valores normais incluem: inflamação do pulmão e do tracto gastrointestinal (GI) e cancro benigno do fígado (2,3).

Os indivíduos que fumam muito apresentam concentrações iniciais de CEA mais elevadas que o normal.

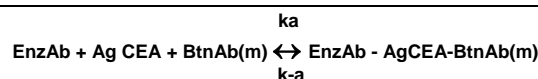
### 3.0 PRINCÍPIO DO TESTE

#### Ensaio imunoenzimométrico:

Neste método, os calibradores, as amostras dos doentes e/ou os controlos (contendo o antígeno CEA nativo) são, em primeiro lugar, adicionados a poços revestidos com estreptavidina. Posteriormente, adicionam-se os anticorpos monoclonais biotinizados e os anticorpos marcados com enzimas e misturam-se os reagentes: estes anticorpos têm uma afinidade e especificidade elevadas e são direccionados contra epitópos distintos do CEA.

A reacção entre os vários anticorpos da CEA e os anticorpos CEA nativos ocorre nos micropoços, sem competição ou obstáculos estéricos, formando um complexo solúvel tipo sandwich.

A interacção é ilustrada pela seguinte equação:



**BtnAb(m)** = Anticorpo Monoclonal Biotinilado (Quantidade em excesso)

**AgCEA** = Antígeno Nativo (Quantidade variável)

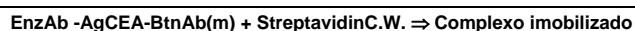
**EnzAb** = Anticorpo marcado por enzima (Quantidade em excesso)

**EnzAb -AgCEA -BtnAb(m)** = Complexo Sandwich de Antígeno-Anticorpos

**$k_a$**  = Taxa Constante de Associação

**$k-a$**  = Taxa Constante de Dissociação

Simultaneamente, o complexo é depositado no poço através da reacção de afinidade elevada da estreptavidina e do anticorpo biotinizado. A interacção é ilustrada abaixo:



**StreptavidinC.W.** = Estreptavidina imobilizada no poço.

**Complexo imobilizado** = complexo tipo sandwich ligado ao poço

Após atingir o equilíbrio, a fracção ligada do anticorpo é separada do antígeno não ligado, através de decantação ou aspiração. A actividade da enzima na fracção ligada ao anticorpo é directamente proporcional à concentração do antígeno nativo. A actividade da enzima presente na superfície do poço é quantificada pela reacção com um substrato adequado para produzir cor. Ao utilizar vários calibradores diferentes de valores antigénicos conhecidos, pode ser gerada uma curva dose-resposta, a partir da qual se pode determinar a concentração de antígeno de um desconhecido.

### 4.0 CONTEÚDO DO KIT

#### 4.1 MICROPLACA (código 66PIA)



1 microplaca de 12 tiras x 8 poços revestidos com estreptavidina e colocada num saco de alumínio com um agente de secagem.







Conservar a 2-8°C

#### 4.2 CALIBRADORES

6 frascos de 1ml cada contendo calibradores de soro para o CEA em soro humano. Foi adicionado um conservante.

Pronto a usar

Conservar a 2-8°C

Calibrador	Símbolo	Código	Concentração ng/ml	Concentração (mUI/ml)
Calibrador 0		66CAL0	0 ng/ml	0 mUI/ml
Calibrador 1		66CAL1	5 ng /ml	50 mUI/ml
Calibrador 2		66CAL2	10 ng /ml	100 mUI/ml
Calibrador 3		66CAL3	25 ng /ml	250 mUI/ml
Calibrador 4		66CAL4	50 ng /ml	500 mUI/ml
Calibrador 5		66CAL5	250 ng /ml	2500 mUI/ml
1 ng/ml = 10 mUI/ml (1ª PRI 73/601)				

**Nota:** Os calibradores, com base em soro humano, foram calibrados usando uma preparação de referência, que foi processada contra a 1ª Preparação de Referência Internacional (PRI # 73/601).

#### 4.3 CONJUGADO (código 66HRP)

CONJ|HRP

1 frasco (13 mL) contendo anticorpo anti-CEA purificado por afinidade, conjugado para HRP e anticorpo IgG (rato) monoclonal biotilado para o CEA em tampão, com corante e conservante.

Pronto a usar.

Conservar a 2-8°C

#### 4.4 SUBSTRATO HS (LS.TMB-H2O2.HK)

SUBS|TMB

1 frasco (13 ml) contendo uma mistura estabilizada de TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogénio). Rótulo da tampa: azul.

Pronto a usar.

Conservar a 2-8°C

#### 4.5 SOLUÇÃO DE PARAGEM (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 frasco (13 ml) de 0,3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rótulo da tampa: vermelho.

Pronto a usar.

Conservar a 2-8°C

**A ficha de segurança MSDS está disponível para ser fornecida ao pessoal laboratorial que assim o solicitar.**

#### 4.6 TAMPÃO DE LAVAGEM: (código TLAVM)(50X)

WASH|BUF|50X

1 frasco (20ml) de solução de lavagem concentrada, contendo um surfactante em solução salina de tampão fosfato. Foi adicionado um conservante.

**Preparação da solução de trabalho de Tampão de Lavagem:** diluir o conteúdo do tampão de lavagem concentrado 50 X para 1000 ml, com água destilada ou desionizada, num recipiente adequado para conservação

**ARMAZENAMENTO** conservar à temperatura ambiente (20-27°C). Estável até 60 dias, no máximo.

#### 5.0 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

- os componentes do kit devem ser armazenados a 2-8°C e não devem ser usados após a data de expiração.
- os reagentes abertos são estáveis durante 60 dias quando conservados a 2-8°C.

#### 6.0 MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Água destilada e desionizada e um cilindro de um litro, limpo, para a diluição do tampão de lavagem.
- Pipeta capaz de distribuir volumes de 25µl com uma precisão superior a 1,5%.
- Doseador(es) para distribuições repetidas de volumes de 0,100ml e 0,300ml com uma precisão superior a 1,5%.
- Lavador automático de microplacas ou uma bisnaga (opcional).
- Leitor de microplacas com capacidade DO de comprimento de onda de 450 nm, 405 nm e 620 nm.
- Papel absorvente mata-borrão para os poços das microplacas.
- Película protectora de plástico ou cobertura de microplaca para as etapas de incubação.
- Aspirador de vácuo (opcional) para as etapas de lavagem.
- Temporizador.
- Materiais de controlo de qualidade

#### 7.0 ADVERTÊNCIAS OU PRECAUÇÕES

##### 7.1 PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

- O kit destina-se apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não está indicado para administração interna ou externa em seres humanos ou animais.
- Através de testes requeridos pela FDA, verificou-se que todos os produtos que contêm soro humano não são reactivos para o Antígeno de Superfície da Hepatite B, VIH 1&2 e Anticorpos do VHC. Dado que nenhum teste pode oferecer uma garantia absoluta da ausência de agentes infecciosos, todos os produtos derivados de soro humano devem ser manuseados como potencialmente perigosos e passíveis de transmitir doença.
- Seguir os procedimentos das Boas Práticas de Laboratório para o manuseamento de produtos derivados de sangue.
- Evitar o contacto com reagentes que contenham peróxido de hidrogénio, ácido sulfúrico e conservantes que podem ser tóxicos, se ingeridos. Não utilizar a boca na pipetagem.
- Seguir os regulamentos locais, estaduais e nacionais no que respeita a eliminação de todos os resíduos.

##### 7.2 PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- Evitar a exposição do reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à luz solar directa, ao metal ou aos oxidantes.
- Evitar a contaminação microbiana dos reagentes.
- Os dados de desempenho aqui apresentados foram obtidos mediante a

utilização de reagentes específicos indicados no folheto da embalagem.

- É importante que seja mantida a constância do tempo de reacção em cada poço para se obterem resultados reproduzíveis.
- A pipetagem das amostras não deve estender-se para além dos 10 minutos, para evitar o desvio do ensaio.
- Se for utilizada mais do que 1 placa, recomenda-se a repetição da curva dose-resposta.
- A adição de solução substrato dá início a uma reacção cinética, que é interrompida pela adição da solução de paragem. Deste modo, a adição do substrato e da solução de paragem deve ser efectuada na mesma sequência, para eliminar qualquer desvio de tempo durante a reacção.
- Os leitores de placas fazem a medição na vertical. Não tocar no fundo dos poços.
- A remoção inadequada da solução aderente durante a(s) etapa(s) de aspiração e decantação pode resultar em replicação fraca e resultados falsos.
- Utilizar componentes do mesmo lote. Não misturar reagentes de lotes diferentes.

#### 8.0 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Dado tratar-se de amostras de sangue e soro, devem adoptar-se as precauções habitualmente requeridas na colheita de amostras por venipunctura.
- Para uma comparação exacta em relação aos valores normais estabelecidos, deve obter-se uma amostra de soro de manhã, estando o doente em jejum.
- O sangue deve ser recolhido num tubo de venipunctura sem aditivos ou anticoagulantes.
- Deixar o sangue coagular. Centrifugar a amostra para separar o soro das células.
- As amostras podem ser conservadas no frigorífico a 2-8°C, durante um período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser ensaiadas dentro deste tempo, podem ser conservadas à temperatura de -20°C até um máximo de 30 dias.
- Evitar congelá-las e descongelá-las repetidamente.
- Quando ensaiada em duplicado, é necessário 0,050ml de amostra.

#### 9.0 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

##### 9.1 PREPARAÇÃO DO ENSAIO

- Deixar que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (20-27°C).
- Formatar os poços das microplacas para cada calibrador, controlo e amostra de doente, que vai ser ensaiada em duplicado. Voltar a colocar as tiras para micropoço não utilizadas dentro do saco de alumínio, selar e conservar a 2-8°C.

##### 9.2 PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

- Pipetar** 25µl do calibrador adequado, controlo ou amostra para dentro dos poços designados.
- Pipetar** 100 µl do conjugado para dentro dos poços;
- Rodar** a microplaca suavemente durante 20-30 segundos, para ajudar a misturar, e colocar a **cobertura**.
- Incubar** à temperatura ambiente durante **60 minutos**.
- Eliminar** o conteúdo da microplaca por aspiração ou decantação. Ao decantar, secar a placa com papel absorvente;
- Lavar** os poços adicionando 300 µl de solução de trabalho de tampão de lavagem (ver 4.6), aspirar em seguida (ou decantar, remover o excesso de solução e secar); Repetir mais 2 vezes para um total de 3 lavagens.  
*Pode ser utilizado um lavador de placas automático ou manual. Para a utilização correcta do mesmo, seguir as instruções do fabricante.*  
*Se se utilizar uma bisnaga, encher cada um dos poços apertando o recipiente (evitar a formação de bolhas de ar) para distribuir a solução de lavagem. Decantar a solução de lavagem e repetir mais 2 vezes.*
- Adicionar** 100 µL de substrato HS a cada poço.
- Incubar** os poços à temperatura ambiente durante **15 minutos**.
- Adicionar** 100 µl de Solução de Paragem utilizando a mesma sequência e tempo adoptados para a distribuição do Substrato HS
- Ler** a 450 e 405 nm com o filtro de referência definido para 620 nm durante 30 minutos.

#### 10.0 CÁLCULO DE RESULTADOS

##### 10.1 VALIDADE DO ENSAIO

A densidade óptica (DO) do calibrador 5 deve ser  $\geq 1,3$ .

##### 10.2 CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve realizar controlos com níveis de intervalo baixos, normais e elevados da curva dose-resposta, para monitorização do desempenho do ensaio. Estes controlos devem ser tratados como desconhecidos e deve determinar-se os valores obtidos em cada procedimento de teste realizado. Devem manter-se tabelas de controlo de qualidade para acompanhar o desempenho dos reagentes fornecidos. Devem empregar-se

métodos estatísticos pertinentes para determinar as tendências. Um desvio significativo, em relação ao desempenho estabelecido, pode indicar alterações imperceptíveis nas condições experimentais ou degradação dos reagentes do kit. Devem ser utilizados reagentes novos para determinar a causa das variações.

### 10.3 CONVERSÃO DE D.O.

As densidades ópticas (D.O.s) de alguns calibradores e amostras podem ser superiores a 2.0; neste caso, podem estar fora do intervalo de medição do leitor de microplacas. Torna-se, assim, necessário efectuar, para as D.O.s superiores a 2.0, uma leitura a 405 nm (=comprimento de onda do pico de leitura), além de 450 nm (comprimento de onda de pico) e 620 (filtro de referência para a subtração de interferências devido ao plástico).

No caso de leitores de microplaca que não possam realizar a leitura da placa com 3 comprimentos de onda em simultâneo,

é aconselhável proceder na seguinte forma:

- Ler a microplaca a 450 nm e a 620 nm.

- Ler novamente a placa a 405 nm e 620 nm.

- Descobrir os poços cujas DOs a 450 nm são superiores a 2.0

- Seleccionar as DOs correspondentes lidas a 405 nm e multiplicar estes valores a 405 nm pelo factor de conversão 3.0 (sendo que  $DO\ 450/DO\ 405 = 3.0$ ), isto é:  $DO\ 450\ nm = DO\ 405\ nm \times 3.0$

Advertência: O factor de conversão 3.0 é meramente indicativo. Para maior exactidão, recomenda-se que o utilizador calcule o factor de conversão específico para o seu próprio leitor.

### 10.4 REDUÇÃO DE DADOS – MÉTODO AUTOMÁTICO

Usar os 4 parâmetros logísticos – preferencial – ou a função “cubic spline” como algoritmo de cálculo.

**NOTA:** Se se utilizar a redução de dados controlada por computador para calcular os resultados do teste, é fundamental que os valores previstos para os calibradores se situem em 10% das concentrações atribuídas.

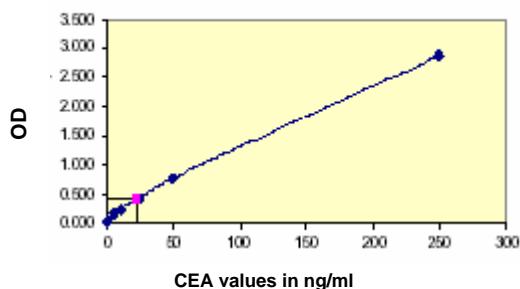
### 10.5 REDUÇÃO DE DADOS: MÉTODO MANUAL

É utilizada uma curva dose-resposta para determinar a concentração do CEA em amostras desconhecidas.

1. Registar a DO obtida da impressão do leitor de microplacas, como descrito no Exemplo 1.
2. Traçar a DO para cada calibrador em duplicado *versus* a concentração de CEA correspondente em ng/ml num papel gráfico linear (não calcular as médias dos duplicados dos calibradores antes de traçar a DO).
3. Desenhar a curva que melhor se adapte através dos pontos traçados.
4. Para determinar a concentração de CEA para um desconhecido, localizar a absorvância média dos duplicados para cada desconhecido, no eixo vertical do gráfico, encontrar o ponto de intersecção na curva e ler a concentração (em ng/ml) a partir do eixo horizontal do gráfico (o cálculo da média dos duplicados pode ser obtido como indicado). No exemplo seguinte, a DO média (0.391) intersecta a curva dose-resposta na (22,5ng/ml) concentração CEA (Ver Figura 1).

EXEMPLO 1				
Amostra ID	Número do poço	DO	DO Média	Valor ng/ml
CAL 0	A1	0.017	0.018	0
	B1	0.019		
CAL 1	C1	0.160	0.159	5
	D1	0.159		
CAL 2	E1	0.231	0.227	10
	F1	0.224		
CAL 3	G1	0.431	0.424	25
	H1	0.418		
CAL 4	A2	1.776	1.770	50
	B2	1.763		
CAL 5	C2	2.851	2.866	250
	D2	2.880		
doente	E2	0.389	0.391	22,5
	F2	0.384		

Figure 1



Os dados apresentados no Exemplo 1 e na Figura 1 têm um carácter meramente ilustrativo e não devem ser utilizados em substituição de uma curva dose-resposta preparada para cada ensaio.

### 10.6 INTERVALO DE MEDIÇÃO

As amostras de doentes com concentrações de CEA acima de 250 ng/ml podem ser diluídas (por exemplo 1/10 ou superior) com soro normal de homem (CEA < 5 ng/ml) e processadas de novo. A concentração da amostra é obtida multiplicando o resultado obtido pelo factor de diluição (10).

### 11.0 VALORES ESPERADOS

Quase 99% dos não fumadores apresentam concentrações de CEA abaixo de 5ng/ml. Do mesmo modo, quase 99% dos fumadores apresentam concentrações de CEA abaixo de 10 ng/ml (4).

TABELA I	
Valores esperados para o kit EIAGEN CEA	
Não fumadores	<5ng/ml
Fumadores	<10ng/ml

É importante ter em consideração que a determinação de uma série de valores que é possível obter através de um determinado método, para uma população de pessoas “normais”, está dependente de uma multiplicidade de factores: a especificidade do método, a população testada e a precisão do método nas mãos do analista.

Por estes motivos, cada laboratório só deve depender do intervalo de valores previstos (estabelecido pelo fabricante), apenas até ser determinado pelos analistas um intervalo de valores interno, usando o método com a população nativa da zona em que o laboratório se situa.

### 12.0 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- As amostras que tiverem sido microbiologicamente contaminadas não devem ser usadas no ensaio. Do mesmo modo, não devem ser utilizadas amostras altamente lipémicas ou hemolizadas.
- O CEA apresenta uma sensibilidade clínica e especificidade baixa como marcador de tumores. Em termos clínicos, um valor elevado de CEA por si só não tem valor diagnóstico como teste para o cancro e apenas deve ser utilizado em conjunto com outras manifestações (observações) clínicas e outros parâmetros de diagnóstico. Existem doentes com cancro colorectal que não exibem valores CEA elevados e estes valores nem sempre se alteram com a progressão ou a regressão da doença. Os fumadores apresentam um intervalo mais elevado de valores de base do que os não fumadores.

### 13.0 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

#### 13.1 PRECISÃO

A precisão intra e inter-ensaios do kit de teste EIAGEN CEA foi determinada através de análises em três níveis diferentes de soros de controlo. O número, os valores médios, o desvio padrão (D.P.) e o coeficiente de variação, para cada um destes soros de controlo, são apresentados nas tabelas 3 e 4.

TABELA 2				
Precisão intra-ensaios (valores em ng/ml)				
Amostra	N	MÉDIA	DP	C.V.
Nível 2	20	4,8	0,35	7,3%
Nível 2	20	21,7	1,35	6,2%
Nível 3	20	60,5	3,58	5,9%

TABELA 3				
Precisão inter-ensaios (valores em ng/ml)				
Amostra	N	MÉDIA	DP	C.V.
Nível 1	10	5,0	0,41	8,2%
Nível 2	10	21,2	1,25	5,9%
Nível 3	10	59,5	3,15	5,3%

\* Tal como medido em 10 experiências em duplicado

#### 13.2 EXACTIDÃO – COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

O kit EIAGEN CEA foi comparado com um método ELISA de referência. Foram processadas espécies biológicas que apresentavam concentrações normais elevadas. O número total de tais amostras foi 202. A equação de regressão quadrada mínima e o coeficiente de correlação foram calculados para o kit EIAGEN CEA, em comparação com o método de referência. Os dados obtidos são indicados na tabela 4.

TABELA 4			
Método	Média	Análise de regressão quadrada mínima	Coefficiente de variação
KIT EIAGEN CEA	5,67	$y = -0,1164 + 1,0324(X)$	0,998
Método de referência	5,75		

#### 13.3 SENSIBILIDADE

O kit EIAGEN CEA tem uma sensibilidade de 0,025 ng. Isto é o equivalente a uma amostra conter uma concentração CEA de 1 ng/ml.

### 13.4 ESPECIFICIDADE

No kit EIAgen CEA foram usados anticorpos altamente específicos para as moléculas CEA. Não foi detectada qualquer interferência com o desempenho do kit EIAgen CEA, aquando da adição de enormes quantidades das seguintes substâncias a um aglomerado de soros humanos.

<b>Ácido Acetilsalicílico</b>	100 µg/ml
<b>Ácido Ascórbico</b>	100 µg/ml
<b>Cafeína</b>	100 µg/ml
<b>AFP</b>	10 µg/ml
<b>PSA</b>	1,0 µg/ml
<b>CA-125</b>	10,000 U/ml
<b>hCG</b>	1000 UI/mL
<b>hLH</b>	10 UI/mL
<b>hTSH</b>	100 mIU/ml
<b>hPRL</b>	100 µg/ml

### 13.5 LINEARIDADE E EFEITO DE GANCHO

Foram utilizadas três preparações de lote diferentes dos reagentes do kit EIAgen CEA para avaliar a linearidade e o efeito de gancho. Foram usadas concentrações enormes de CEA (> 60,000 ng/ml) para diluições lineares em aglomerados de soros de doentes humanos. O teste não mostrou qualquer efeito de gancho com concentrações até 60,000 ng/ml e com uma recuperação de dose entre 92,0 e 111,4%.

### 14.0 AUTOMATIZAÇÃO

A Adaltis está disponível para fornecer, mediante pedido, os protocolos de aplicação relativos à automatização adequada nos analisadores de tiras de microtítulos Adaltis (Labotech, Personal Lab e Nexgen) .

### 15.0 SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

ERRO	POSSÍVEIS CAUSAS / SUGESTÕES
DO muito diferente (± 50%) da DO indicada no CQ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dosagem incorrecta do volume de reagentes (sugestão: verificar a correspondência entre o volume doseado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibrar novamente as pipetas)</li> <li>- temperatura incorrecta ou tempo de incubação incorrecto (sugestão: mais cuidado com a manutenção da incubadora; anotar o horário de início da incubação)</li> <li>- erro na lavagem ou na leitura do espectrofotómetro (sugestão: verificar o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos)</li> <li>- contaminação do Substrato ou do Conjugado (sugestão: utilizar apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos)</li> </ul>
Baixos resultados reprodutíveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dosagem irregular do volume das amostras ou reagentes (sugestão: verificar a precisão das pipetas e a correspondência entre o volume doseado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibrar novamente as pipetas)</li> <li>- erro na lavagem ou na leitura (sugestão: verificar o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos)</li> <li>- contaminação do Substrato (sugestão: utilizar apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos)</li> <li>- poluição ou degradação dos reagentes (sugestão: utilizar pontas adequadas, recipientes de plástico descartáveis e limpos para os reagentes e água destilada ou água equivalente de alta qualidade)</li> </ul>
Nenhuma reacção colorimétrica após a adição do substrato	<ul style="list-style-type: none"> <li>- alguns reagentes não foram pipetados</li> <li>- forte contaminação do conjugado ou do Substrato</li> <li>- erros na execução do procedimento do ensaio (ex.: pipetagem accidental dos reagentes numa sequência incorrecta ou a partir do frasco errado, etc.)</li> </ul>
Reacção demasiado baixa (D.O.s demasiado baixas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tempo de incubação demasiado curto, temperatura da incubação demasiado baixa</li> </ul>
Reacção demasiado alta (D.O.s demasiado altas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tempo de incubação demasiado longo, temperatura de incubação demasiado alta</li> <li>- baixa qualidade da água para o tampão de lavagem (baixo grau de desionização)</li> <li>- lavagem insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)</li> </ul>
Aspectos inexplicáveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- contaminação das pipetas, pontas ou recipientes</li> <li>- lavagem irregular e insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)</li> </ul>
CV% intra-ensaio demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- os reagentes e/ou tiras não alcançaram a temperatura ambiente antes da utilização</li> <li>- O sistema de lavagem da placa não está a lavar devidamente (sugestão: limpar a cabeça do sistema de lavagem)</li> </ul>
CV% entre ensaios demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- condições de incubação não constantes (tempo, temperatura)</li> <li>- controlos e amostras não doseados ao mesmo tempo (com os mesmos intervalos) (verificar a ordem da pipetagem)</li> <li>- variação relacionada com as pessoas intervenientes</li> </ul>

### 15.0 BIBLIOGRAFIA

1. Gold P, Freedman SO, *J Exp Med*, **121**, 439 (1965).
2. Zamcheck N, *Adv Intern Med*, **19**, 413 (1974).
3. Rayncao G, Chu TM, *JAMA*, **220**, 381 (1972).
4. Wild D, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press (1994) p444.
5. Sorokin JJ, Sugarbaker PH, Zamcheck N, Pisick M, Kupchik HZ, Moore FD. "Serial carcinoemryonic antigen assays. Use in detection of cancer recurrence." *JAMA* 1974;228:49-53.

6. Mackay AM, Patel S, Carter S, Stecens U, Lawrence DJR, Cooper EH, et al. "Role of serial plasma assays indetection of recurrent and metastatic colorectal carcinomas." *Br. Med. Jr.* 1974; 4:382-385.
7. Sikorska H, Schuster J, Gold P. "Clinical applications of carcinoemryonic antigen." *Cancer Detection Preview* 1988; 12:321-355.
8. Minton JP, Martin EW Jr. "The use of serial CEA determinations to predict recurrence of colon cancer and when to do a secondlook surgery." *Cancer* 1978;42:1422-27.
9. Staab HJ, Anderer FA, Stumpf E, Fischer R. "Slope analysis of the postoperative CEA time course and its possible application as an aid in diagnosis of disease progression in gastrointestinal carcinoma." *Am. J.Surgery* 1978;136:322-327.
10. Thomas P, Toth CA, Saini KS, Jesup JM, Steele G. Jr. "The structure, metabolism and function of carcinoemryonic antigen gene family." *Biochem Biophys Acta* 1990;1032:177-189.
11. Yamashita K, Totami K, Kuroki M, Ueda I, Kobata A. "Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoemryonic antigens." *Cancer Research* 1987;47:3451-3459.
12. Hammerstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larson A, Ghosh R, et al. "Antigenic sites in carcinoemryonic antigen." *Cancer Research* 1989;49:4852-58.
13. National Institute of Health. Carcinoemryonic Antigen: Its role as a marker in the management of cancer. A national Institute of Health Consensus Development Conference. *Ann.Intern.Med.* 1981;94:407-409.