



DCM051-9
Ed. 01/2015

CEA ELISA

per analisi di routine

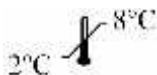
Determinazione quantitativa dell'antigene Carcinoembrionico (CEA) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO051

DESTINAZIONE D'USO

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

Il kit CEA ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'antigene Carcinoembrionico (CEA) è una glicoproteina, di 180 kD, coinvolta nell'adesione cellulare. È prodotto normalmente durante lo sviluppo fetale, ma la produzione cessa prima della nascita. Di conseguenza, non è solitamente presente nel sangue degli adulti in buona salute, anche se i livelli sono aumentati nei pesanti fumatori.

CEA è stato identificato in campioni di tessuti di cancro al colon umano. Successivamente è stato trovato nel siero di pazienti con carcinoma colon-rettale ed anche pazienti con altri tipi di cancro presentano livelli elevati di CEA, quindi come marker tumorale può essere impiegato per controllare la risposta al trattamento del cancro al colon.

CEA ed i geni relativi costituiscono la famiglia di CEA che appartiene al superfamiglia delle immunoglobuline. Il cancro che più frequentemente causa un aumento del CEA è il cancro del colon e del retto. Altre forme di cancro incluso il cancro del pancreas, dello stomaco, del seno, del polmone e determinati tipi di cancro alla tiroide e di cancri ovarici presentano elevati livelli di CEA. Le situazioni benigne in cui il CEA presenta livelli elevati, includono il fumo, infezioni, infiammazione delle viscere, pancreatiti, la cirrosi epatica ed alcuni tumori benigni negli stessi organi in cui un CEA elevato indica il cancro. La radioterapia e la chemioterapia possono causare un aumento provvisorio dei livelli di CEA, dovuto alla morte delle cellule tumorali ed al rilascio di CEA nella circolazione sanguigna. I tumori benigni non causano solitamente un aumento superiore a 10 ng/mL.

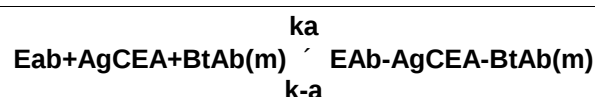
2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel presente metodo i calibratori, i campioni dei pazienti e/o i controlli (contenenti l'antigene CEA nativo) sono aggiunti ai pozzetti della micropiastre 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 micropiastre, la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e dà luogo ad un complesso *sandwich* solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtAb(m) = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

AgCEA = Antigene Nativo (Quantità Variabile)

Eab = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

Eab-AgCEA-BtAb(m) = Complesso Sandwich Antigene-Anticorpi

k_a = Costante di Associazione

k_{-a} = Costante di Dissociazione

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

Eab-AgCEA-BtAb(m)+Streptavidina C.W. fi complesso immobilizzato

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.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/5106-0
CAL1	REF	DCE002/5107-0
CAL2	REF	DCE002/5108-0
CAL3	REF	DCE002/5109-0
CAL4	REF	DCE002/5110-0
CAL5	REF	DCE002/5111-0

2. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpi Anti CEA coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e Anti CEA Biotinilato

REF DCE002/5102-0

3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con streptavidina

REF DCE002/5103-0

4. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

5. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE005-0

6. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strisce da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di CEA da 5 ng/mL a 250 ng/mL.
- 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 l'accertamento del cancro e quindi dovrebbero essere utilizzati sempre insieme ad altre osservazioni cliniche e parametri diagnostici. Può accadere che pazienti con cancro colon-rettale non presentino valori elevati di CEA, e valori elevati di CEA non sempre variano con la progressione o la regressione del cancro. I fumatori presentano una più ampia gamma di valori di base rispetto ai non fumatori.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si

raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori ($C_0 \dots C_5$)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono stati tarati usando una preparazione di riferimento che è stata calibrata contro 1st IRP 73/601 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ng/mL	0	5	10	25	50	250

Una volta aperti i Calibratori sono stabili per 6 mesi a $2 \pm 8^\circ\text{C}$.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a $2 \pm 8^\circ\text{C}$ per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni sierici o plasmatici umani, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; quindi lasciare coagulare il sangue e centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere conservati a $2 \pm 8^\circ\text{C}$ per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile analizzare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperatura 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.

Per campioni con concentrazione superiore a 250 ng/mL diluire il campione con C_0 .

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente ($22\text{--}28^\circ\text{C}$) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a $2\text{--}8^\circ\text{C}$: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a $2\text{--}8^\circ\text{C}$.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione ($C_0\text{--}C_5$), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore $C_0\text{--}C_5$	25 μL		
Campione		25 μL	
Conjugate	100 μL	100 μL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente ($22\text{--}28^\circ\text{C}$). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 μL	100 μL	100 mL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente ($22\text{--}28^\circ\text{C}$), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 μL	100 μL	100 μL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CEA per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Si dovrebbero compilare le tabelle di controllo qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Per accertare il trend dovrebbero essere impiegati metodi statistici adeguati. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le

intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato nelle condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Per determinare il motivo delle variazioni si dovrebbero usare reagenti freschi.

8. RISULTATI

8.1. Note

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 oltre alla lettura a 450 nm e a 620 nm.

Se si utilizzano 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.

La OD del calibratore 5 deve essere $\geq 1,3$.

8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0 - C_5) e di ogni campione.

8.3. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun Calibratore (C_0 - C_5) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.4. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Circa il 99% dei non fumatori hanno concentrazioni di CEA minori di 5 ng/mL; similmente circa il 99% dei fumatori hanno concentrazioni di CEA minori di 10 ng/mL (4).

	ng/mL
Non fumatori	<5
Fumatori	<10

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una

popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo in un unico dosaggio. La variabilità intra-assay è $\leq 5,8\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 9,9\%$.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 10 - 20 - 40 ng/mL di CEA, ha dato un valore medio ($\pm SD$) di $100,7\% \pm 7,2\%$.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di CEA misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,11 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

Al fine di determinare la specificità della coppia di anticorpi usati per il CEA Elisa kit, sono state aggiunte massicce dosi dei relativi antigeni ad un pool di sieri di pazienti:

Analita	Concentrazione	Cross Reaction
CEA		100 %
β -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

10.5. Correlazione

Il kit Diametra CEA ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 167 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 1,019x - 0,200$$

$$r^2 = 0,992$$

$$y = \text{CEA kit commerciale}$$

$$x = \text{CEA kit Diametra}$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

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, et al JAMA 228:49-53 (1974)
- 6) Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)
- 7) Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)
- 8) Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)
- 9) Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)
- 10) Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)
- 11) Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)
- 12) Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)
- 13) Ann.Inter.Med.1981;94:407-409

Ed. 01/2015

DCM051-9

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM051-9
Ed. 01/2015

CEA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO051

INTENDED USE

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

CEA ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein, with a molecular weight of 180 kD, 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.

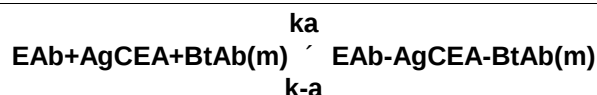
The most frequent cancer which causes an increased CEA is cancer of the colon and rectum. Others include cancers of the pancreas, stomach, breast, lung, and certain types of thyroid and ovarian cancer. Benign conditions which can elevate CEA include smoking, infections, inflammatory bowel disease, pancreatitis, 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 does not usually cause an increase above 10 ng/mL.

2. PRINCIPLE

In this method, the calibrators, the patient specimens and/or the controls (containing the native CEA antigen) are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labelled 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:



BtAb(m) = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

AgCEA = Native Antigen (Variable Quantity)

EAb = Enzyme labelled Antibody (Excess Quantity)

EAb-AgCEA-BtAb(m) = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

k_a = Rate Constant of Association

k_a = 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 a washing step.

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 quantified 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.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF	DCE002/5106-0
CAL1	REF	DCE002/5107-0
CAL2	REF	DCE002/5108-0
CAL3	REF	DCE002/5109-0
CAL4	REF	DCE002/5110-0
CAL5	REF	DCE002/5111-0

2. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Antibodies anti CEA conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) and anti CEA biotinylated

REF DCE002/5102-0

3. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Microplate coated with streptavidin

REF DCE002/5103-0

4. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE004-0

5. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

6. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use; once opened, it is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of CEA from 5.0 to 250 ng/mL.
- 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.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.

- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready to use, are calibrated using a reference preparation which was assayed against the 1st IRP 73/601 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	5	10	25	50	250

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of the Sample

The specimens shall be human serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

For serum preparation, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; then allow the blood to clot and centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

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

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

For sample with concentration over 250 ng/mL dilute the sample with Calibrator 0.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Samples		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hours. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of 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% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Note

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.

The OD of calibrator 5 should be ≥ 1.3 .

8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C_0 - C_5) and of each sample.

8.3. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (C_0 - C_5) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.4. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

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

	ng/mL
Non-smoker	<5 ng/mL
Smoker	<10 ng/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

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

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements (20x) of three different control sera in

different lots of kit. The between assay variability is $\leq 9.9\%$.

10.2. 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.

10.3. Sensitivity

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

10.4. 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 %
β -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

10.5. Correlation

Diametra 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:

$$y = 1.019x - 0.200$$

$$r^2 = 0.992$$

$$y = \text{CEA Predicate kit}$$

$$x = \text{CEA Diametra kit}$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- 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, et al JAMA 228:49-53 (1974)
- 6) Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)
- 7) Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)
- 8) Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)
- 9) Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)
- 10) Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)
- 11) Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)
- 12) Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)
- 13) Ann.Inter.Med.1981;94:407-409

Ed. 01/2015

DCM051-9

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM051-9
Ed. 01/2015

CEA ELISA

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa del antígeno carcinoembrionario CEA en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver la etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO051

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático directo para la determinación cuantitativa de la concentración del antígeno carcinoembrionario (CEA) en suero o plasma humano.

El kit CEA ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

EL Antígeno Carcinoembriogénico (CEA) es una glicoproteína de 180 kDa, que participa en la adhesión celular. Se produce normalmente durante el desarrollo fetal, pero la producción se detenga antes del nacimiento. Por lo tanto, está normalmente presente en la sangre de los adultos sanos, aunque los niveles son mayores en los fumadores.

CEA fue identificado en muestras de tejido de cáncer de colon humano. Fue encontrado en el suero de pacientes con cáncer colorrectal y también los pacientes con otros tipos de cáncer tienen niveles elevados de CEA, como un marcador tumoral puede ser utilizado para monitorizar la respuesta al tratamiento de cáncer de colon.

CEA y genes relacionados constituyen la familia de la CEA, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El cáncer que más comúnmente causa un aumento en el CEA es el cáncer del colon y el recto. Otras formas de cáncer, incluyendo cáncer de páncreas, estómago, mama, pulmón y ciertos tipos de cáncer de tiroides y el cáncer de ovario tienen niveles elevados de CEA.

Las situaciones benignas en la que la CEA tiene un alto nivel, se encuentran el tabaquismo, infección, inflamación del intestino, pancreatitis, cirrosis hepática y algunos tumores benignos en los mismos órganos en los que un alto CEA indica cáncer. La radioterapia y la quimioterapia pueden causar un aumento temporal de los niveles de CEA, debido a la muerte de las células cancerosas y la liberación de CEA en el torrente sanguíneo. Los tumores benignos generalmente no causan un aumento superior a 10 ng/mL.

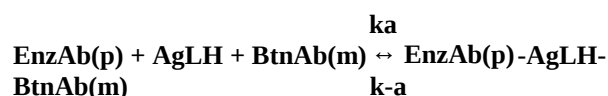
2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

En este método, los calibradores, muestras y/o controles (que contienen el antígeno CEA nativo), se añaden a los pocillos de la microplaca sensibilizados

con estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-CEA monoclonales biotinilados o bien anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítopos distintos.

En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtnAb(m) = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

AgLH = antígeno nativo (cantidad variable)

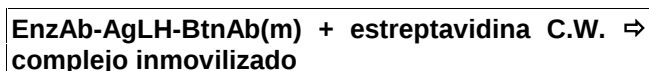
EnzAb = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

k_a = constante de asociación

k_{-a} = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:



Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = enlace sándwich anticuerpo-antígeno unido a la superficie

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante

la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/5106-0
CAL1	REF DCE002/5107-0
CAL2	REF DCE002/5108-0
CAL3	REF DCE002/5109-0
CAL4	REF DCE002/5110-0
CAL5	REF DCE002/5111-0

2. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo anti CEA conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anticuerpo anti CEA biotinilado

REF DCE002/5102-0

3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/5103-0

4. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

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

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

REF DCE005-0

6. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 3 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.

- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de CEA de 5 ng/mL y 250 ng/mL.
- CEA posee una baja sensibilidad y especificidad clínica como marcador tumoral. Los valores altos de CEA por sí solos no tienen valor diagnóstico clínico como prueba del cáncer, por lo que únicamente pueden utilizarse junto con otras manifestaciones clínicas (observaciones) y parámetros de diagnóstico. Puede ser que los pacientes con cáncer colorrectal no muestran CEA elevado, mientras que los valores elevados de CEA no siempre cambian con la progresión o regresión de la enfermedad. Los fumadores demuestran un rango más altos de valores basales que los no fumadores.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.

- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los calibradores son listo para usar, son calibrados usando una preparación de referencia que se calibró contra 1st IRP 73/601 y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	5	10	25	50	250

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL.

Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación de la muestra

Las muestras deben ser de sangre en tipo sérico y plasmática, y es necesario observar las precauciones usuales en las muestras obtenidas por venipunción. Para una comparación precisa con los valores normales establecidos, las muestras de suero deben obtenerse en ayunas matinal.

Para el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de venipunción sin aditivos o anticoagulantes. Deje que la sangre coagule. Centrifugue la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras se pueden conservar refrigeradas a 2-8°C durante un máximo de 5 días. Si no es posible analizarlas en dicho periodo de tiempo, se pueden conservar a una temperatura de -20°C durante 30 días. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos.

Para analizar duplicados se requiere 0,050 mL de la muestra.

Para muestras con concentraciones superiores a 250 ng/mL diluir la muestra con Estandar 0.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra		25 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar a temperatura ambiente (22÷28°C) durante 15 minutos, protegida de la luz			

Solución de parade	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá comprobar controles con niveles de hipotiroidismo, eutiroidismo e hipertiroidismo para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del kit. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para la reproducibilidad interensayo. Además, la absorbancia máxima debe respetar los valores de las sesiones anteriores. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Notas

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 2,0. En ese caso, podrían estar fuera del rango de medición del lector de microplacas. Por lo tanto, en estos casos es necesario realizar una lectura a 405 nm (= longitud de onda de entrada pico) además de a 450 nm (longitud de onda pico) y a 620 nm (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico).

Si se utilizan lectores no aptos para la lectura a tres longitudes de onda simultáneamente, se recomienda realizar lo siguiente:

- leer la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- volver a leer la microplaca a 405 nm y a 620 nm.
- seleccionar los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- seleccionar las DO correspondientes leídas a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 nm por el factor de conversión 3,0 (donde $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$), es decir: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$

Advertencia: El factor de conversión 3,0 es solo una sugerencia. Para mayor precisión, se recomienda calcular el factor de conversión específico del lector empleado.

La densidad óptica del estandar 5 debe ser de 5 1.3.

8.2. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

8.3. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (E_m) en función de las concentraciones de los Calibradores (C_0 - C_5).

Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.4. Cálculo de los resultados

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

9. VALORES DE REFERENCIA

Aproximadamente el 99% de los no fumadores tienen concentraciones de CEA menores de 5 ng/mL; del mismo modo el 99% de los fumadores tienen concentraciones de CEA menores de 10 ng/mL (4).

	ng/mL
No fumadores	< 5
Fumadores	< 10

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 5,8\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 9,9\%$.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 10 - 20 - 40 ng/mL de CEA ha dado un valor medio ($\pm SE$) de $100.7\% \pm 7.2\%$.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de CEA medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,11 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

En el kit CEA ELISA se han utilizado anticuerpos de alta especificidad para moléculas de CEA. No se detectaron interferencias en el rendimiento del kit CEA después de añadir cantidades masivas de las siguientes sustancias a un pool de suero humano.

Analito	Concentración	Reacción cruzada
CEA		100%
bHCG	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

10.5. Correlación

El kit CEA ELISA Diametra (X) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 167 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$Y = 1,019 \cdot X - 0,200$$

$$r^2 = 0,992$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- 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, et al JAMA 228:49-53 (1974)
- 6) Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)
- 7) Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)
- 8) Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)
- 9) Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)
- 10) Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)
- 11) Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)
- 12) Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)
- 13) Ann.Inter.Med.1981;94:407-409

Ed. 01/2015

DCM051-9

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs