



CEA-IRMA

KIP0331

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

CEA-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative measurement of human Carcino Embryonic Antigen (CEA) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource CEA-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP0331 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Carcino Embryonic Antigen (CEA)

CEA is a 200.000 Daltons oncofetal glycoprotein expressed by normal tissues during the first six months of fetal life. Later on the expression of CEA by normal cells becomes largely repressed except in cancer tissues of various cell types, which may secrete large amounts of this oncofetal protein into the circulation. Widely accepted as a useful adjunct for monitoring the course of cancer diseases, CEA should not be regarded as a tumor-specific marker because it is still secreted in small amounts by certain normal tissues during adult life, with small serum level increases in case of benign diseases such as cirrhosis, hepatitis, inflammatory bowel diseases, renal failure and in heavy smokers. Therefore, the measurement of CEA serum concentration for diagnostic purposes must be considered with great care.

B. Clinical applications

· *Monitoring of cancer diseases*

When measured before any therapy, the serum concentration of CEA is one of the best parameters to monitor the evolution of cancer following surgery, chemotherapy, etc... After remission, CEA levels appear often as a good screening test for early detection of tumor recurrence.

· *Diagnostic adjunct in cancer*

Although not specific for cancer when elevated to less than 20 ng/ml, CEA levels above this limit are highly suggestive of malignancy (less than 0.5% false positive).

· *Prognostic adjunct in cancer*

CEA levels in serum provide important prognostic information because a direct relationship has been established between CEA serum concentration and Dukes classification in colon. The same relationship exists probably also in mammary carcinoma and lung carcinoma where very high CEA levels occur almost exclusively in case of disseminated metastasis.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource CEA-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mabs1, the capture antibodies, are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mabs1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. The use of several distinct Mabs avoids hyperspecificity, common to two-site IRMA, as well as a need of a shaker or long incubation at 37°C.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents		96 tests Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti CEA (monoclonal antibodies)		2 x 48	violet	Ready for use
Ab ¹²⁵I Anti-CEA-¹²⁵I (monoclonal antibodies) in phosphate buffer with bovine serum albumin, azide (<0.1%), EDTA and inert red dye		1 vial 5.5 ml 440 kBq	red	Ready for use
DIL SPE Specimen diluent in human plasma with thymol		1 vial lyophil.	black	Add distilled water (see exact amount on vial label)
CAL N Calibrators 0-5 in human plasma with thymol (see exact value on vial labels)		6 vials lyophil.	yellow	Add 1.0 ml distilled water
WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)		1 vial 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls 1 and 2 in human plasma and thymol		2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note:

1. Use the content of the diluent vials for sera dilutions.
2. 1 IU of the calibrator is equivalent to 1 IU of the 1st IRP of human CEA 73/601.
1 IU of the calibrator is equivalent to 100 ng

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 500 µl and 1000 µl (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Pipette for delivery of 5 to 10 ml of distilled water
4. Vortex mixer
5. Magnetic stirrer
6. Incubator at 37°C
7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators** : Reconstitute the calibrators 0-5 with 1.0 ml distilled water.
- B. Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- D. Diluent** : Reconstitute the diluent with the amount of distilled water as mentioned on the vial label.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution of the calibrators and controls, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months.
- Reconstituted specimen diluent is stable for 8 weeks at 2 to 8°C.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

X. PROCEDURE

A. Handling notes

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

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, samples, controls and dispense 100 µl of each into the respective tubes.
3. Dispense 50 µl of anti-CEA- ^{125}I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 2 hours at 37°C.
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
9. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of CEA (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

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

CEA-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		216032	100
Calibrator	0.0 ng/ml	679	
	2.0 ng/ml	1581	0.42
	6.0 ng/ml	3621	1.36
	20.0 ng/ml	8620	3.68
	60.0 ng/ml	23790	10.70
	200.0 ng/ml	64556	29.57

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 0.17 ng/ml.

B. Specificity

Cross reactivity with the normal cross-reacting antigens NCA & NCA-2 and mal-CEA & mbp-CEA was evaluated. Serum samples were spiked with various amounts of NCA, NCA-2, mal-CEA or mbp-CEA as shown in the table below.
Cross reactivity with NCA is a known phenomenon that is also observed with other CEA assays (see NEQAS report Comments for CEA. Distribution 65. 1993.)

sample	composition	Theoretical concentration (ng/ml)	CEA-IRMA result (ng/ml)
C051	-	-	2.3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2.3	5.7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2.3	6.6
C066	-	-	5.9
C076	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L)	15.9	15.8
C068	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15.9	18.5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5.9	6.9
C081	-	-	3.7
C082	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3.7	3.5
C087	+ CEA (73/603 at 100 U/L)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbp-CEA	14	14.3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49.6

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	Replicate	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	Replicate	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	12.2 ± 0.3	2.3	A	20	5.3 ± 0.4	7.4
B	20	22.8 ± 0.8	3.1	B	20	21.4 ± 1.1	5.1

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST		
Added CEA (ng/ml)	Recovered CEA (ng/ml)	Recovery (%)
5	4.7	94.0
12.5	11.1	88.8
35	30.9	88.3
50	45.5	91.0
100	98.4	98.4

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
1	1/1	195.2	195.2
	1/2	97.6	100.1
	1/4	48.8	57.2
	1/8	24.4	30.2
	1/16	12.2	13.6
	1/32	6.1	7.0
	1/64	3.1	3.4
	1/128	1.5	2.8
2	1/1	164.8	164.8
	1/2	82.4	89.7
	1/4	41.2	52.2
	1/8	20.6	25.6
	1/16	10.3	11.0
	1/32	5.2	6.4
	1/64	2.6	3.5
	1/128	1.3	1.1

Samples were diluted with specimen diluent.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

TIME DELAY				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7.8	8.1	8.0	8.0
S 2 (ng/ml)	27.0	26.4	26.7	25.8

F. Hook-effect

A Hook effect can be observed above 25000 ng/ml CEA.

XIV. LIMITATIONS

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

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XVI. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

% DISTRIBUTION OF CEA VALUES					
	Number	0-3.0 ng/ml	3.1-5.0 ng/ml	5.1-10.0 ng/ml	> 10 ng/ml
Healthy					
Non-smokers	110	96.4	2.7	0.9	0
Smokers	64	78.1	10.9	7.8	3.1
TOTAL	174	89.7	5.7	3.4	1.1
Non-malignant					
Cirrhosis	37	29.7	13.5	37.8	18.9
Crohn	26	88.5	7.7	0	3.8
Malignant					
Colorectal	58	31.0	6.9	10.3	51.7
Mammary	50	60.0	14.0	10.0	16.0
Gastric	61	42.6	8.2	13.1	36.1
Pulmonary	50	30.0	12.0	22.0	36.0
Ovarian	50	84.0	2.0	8.0	6.0

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

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

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

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

- BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J. Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38
- BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187
- GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481
- HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140

- LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609
- National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375
- RODGERS G.T., 1976
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373
- STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) ml
Calibrators (0-5) Samples Tracer	- - 0.05	0.1 - 0.05	- 0.1 0.05
Incubation	2 hours at 37°C		
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

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

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

CEA-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'Antigène Carcino-Embryonnaire humain (CEA) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource CEA-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP0331 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. l'Antigène Carcino-Embryonnaire (CEA)

Le CEA est une glycoprotéine oncofœtale de 200.000 Dalton exprimée par des tissus normaux pendant les six premiers mois de la vie fœtale. Après, l'expression du CEA par des cellules normales devient généralement réprimée sauf dans des tissus cancéreux de différents types de cellules, qui peuvent sécréter des quantités considérables de cette protéine oncofœtale dans la circulation. Bien que le CEA soit généralement accepté comme un moyen utile pour suivre le développement des maladies cancéreuses, il ne peut pas être considéré comme un marqueur tumeur spécifique parce qu'il est encore sécrété en faible quantité par quelques tissus normaux pendant la vie adulte, avec de faibles augmentations des niveaux dans le sérum en cas de maladies bénignes comme la cirrhose, l'hépatite, des maladies inflammatoires intestinales, l'insuffisance rénale et des grands fumeurs. Voilà pourquoi les mesures de la concentration du CEA dans le sérum à des fins diagnostiques doivent être interprétées avec précaution.

B. Applications Cliniques

· *Suivre des maladies cancéreuses*

Si la concentration du CEA dans le sérum est mesurée avant toute thérapie, elle peut être l'un des meilleurs paramètres pour suivre l'évolution du cancer après chirurgie, chimiothérapie, etc... Après une rémission, les niveaux du CEA apparaissent souvent comme un bon test de dépistage pour la détection précoce de la récurrence de la tumeur.

· *Moyen diagnostique pour le cancer*

Bien que les niveaux du CEA ne soient pas spécifiques pour le cancer en dessous de 20 ng/ml, ils sont des indicateurs importants de malignité au dessus de cette limite (moins de 0.5% de faux résultats positifs).

· *Moyen pronostique pour le cancer*

Les niveaux du CEA dans le sérum offrent des informations pronostiques importantes parce qu'il existe une relation directe entre la concentration du CEA dans le sérum et la classification de Dukes pour le cancer du côlon. La même relation existe probablement aussi pour le cancer mammaire et le cancer pulmonaire qui présentent de très hauts niveaux de CEA presque exclusivement en cas de métastase disséminée.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource CEA-IRMA est une trousse de dosage radio-immunométrique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L'addition de Mab2, l'anticorps signal marqué avec l'125I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène. L'utilisation de plusieurs Mabs différents évite l'hyperspécificité, commune aux IRMA deux-sites, aussi bien que la nécessité d'un agitateur ou d'une incubation longue à 37°C.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Tubes recouverts avec l'anti CEA (anticorps monoclonal)	2 x 48	violet	Prêt à l'emploi
Ab 125I TRACEUR: CEA marquée à l'125Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%), EDTA et un colorant rouge inactif	1 flacon 5,5 ml 440 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
DIL SPE Diluant du spécimen dans du plasma humain et du thymol	1 flacon lyophilisé	Noir	Ajouter d'eau distillée (voir quantité exacte sur l'étiquette)
CAL N Calibrateur N = 0 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain et du thymol	6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note: 1. Utiliser le Diluant du Spécimen pour la dilution des échantillons.
2. 1 IU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 IU du 1er IRP du CEA humain 73/601.
3. 1 IU du calibrateur est équivalent à 100 ng.

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 500 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Pipette pour la distribution de 5 à 10 ml d'eau distillée.
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Incubateur à 37°C
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'125I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 1,0 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.
- D. **Diluant** : Reconstituer le diluant avec la quantité d'eau distillée indiquée sur l'étiquette.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après la reconstitution des calibrateurs et des contrôles, des aliquots doivent être faits et gardés à -20°C pendant 3 mois au maximum.
- Le diluant du spécimen reconstitué est stable pendant 8 semaines à 2 à 8°C.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

X. MODE OPERATOIRE

- A. **Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
- B. **Mode opératoire**
 - Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, contrôle, échantillon. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
 - Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Ensuite, distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
 - Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
 - Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
 - Incuber pendant 2 heures à 37°C.
 - Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
 - Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
 - Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
 - Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décantier).
 - Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décantier) le reste de liquide.
 - Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

XII. DONNEES TYPES

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

CEA-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		216032	100
Calibrateur	0,0 ng/ml	679	
	2,0 ng/ml	1581	0,42
	6,0 ng/ml	3621	1,36
	20,0 ng/ml	8620	3,68
	60,0 ng/ml	23790	10,70
	200,0 ng/ml	64556	29,57

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

- A. Sensibilité**
Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,17 ng/ml.
- B. Spécificité**
La réactivité croisée avec les antigènes "cross-réactifs" normaux NCA & NCA-2 et mal-CEA & mbp-CEA a été évaluée. Des échantillons de sérum ont été enrichis avec des quantités diverses de NCA, NCA-2, mal-CEA ou mbp-CEA comme décrit dans le tableau ci-dessous.
La réactivité croisée avec NCA est un phénomène connu qui peut être observé aussi avec d'autres tests CEA (voir NEQAS Commentaires du rapport pour CEA. Distribution 65. 1993.)

Echantillon	composition	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
C051	-	-	2,3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2,3	5,7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2,3	6,6
C066	-	-	5,9
C076	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L)	15,9	15,8
C068	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15,9	18,5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5,9	6,9
C081	-	-	3,7
C082	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3,7	3,5
C087	+ CEA (73/603 at 100 U/L)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbp-CEA	14	14,3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49,6

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	12,2 ± 0,3	2,3	A	20	5,3 ± 0,4	7,4
B	20	22,8 ± 0,8	3,1	B	20	21,4 ± 1,1	5,1

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	CEA ajoutée (ng/ml)	CEA récupérée (ng/ml)	Récupération (%)
A	5	4,7	94,0
	12,5	11,1	88,8
	35	30,9	88,3
	50	45,5	91,0
	100	98,4	98,4

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
1	1/1	195.2	195.2
	1/2	97.6	100.1
	1/4	48.8	57.2
	1/8	24.4	30.2
	1/16	12.2	13.6
	1/32	6.1	7.0
	1/64	3.1	3.4
	1/128	1.5	2.8
2	1/1	164.8	164.8
	1/2	82.4	89.7
	1/4	41.2	52.2
	1/8	20.6	25.6
	1/16	10.3	11.0
	1/32	5.2	6.4
	1/64	2.6	3.5
	1/128	1.3	1.1

Les échantillons ont été dilués avec le Diluant du Spécimen.

- E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon**
Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7,8	8,1	8,0	8,0
S 2 (ng/ml)	27,0	26,4	26,7	25,8

- F. Effet crochet**
Un effet crochet peut être observé au-dessus de 25000 ng/ml de CEA.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro.

Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.

Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTROLE QUALITE INTERNE

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

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

% DISTRIBUTION DES VALEURS DU CEA					
	Nombre	0-3,0 ng/ml	3,1-5,0 ng/ml	5,1-10,0 ng/ml	> 10 ng/ml
Sain					
Non-fumeurs	110	96,4	2,7	0,9	0
Fumeurs	64	78,1	10,9	7,8	3,1
TOTAL	174	89,7	5,7	3,4	1,1
Non maligne					
Cirrhose	37	29,7	13,5	37,8	18,9
Crohn	26	88,5	7,7	0	3,8
Maligne					
Colorectal	58	31,0	6,9	10,3	51,7
Mammaire	50	60,0	14,0	10,0	16,0
Gastrique	61	42,6	8,2	13,1	36,1
Pulmonaire	50	30,0	12,0	22,0	36,0
Ovarien	50	84,0	2,0	8,0	6,0

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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

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

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

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

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

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

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

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38
- BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187
- GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the guman digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481
- HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140
- LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal. mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609
- National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375
- RODGERS G.T., 1976
Heterogeinity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373
- STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRATEURS (ml)	ECHANTIL- LON(S) (ml)
Calibrateurs (0-5) Echantillons Traceur	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Incubation	2 heures à 37°C		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 aspiration 2,0 aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Lees het hele protocol vóór gebruik.

CEA-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van humaan Carcino-embryonaal Antigeen (CEA) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. Gedeponiseerd handelsmerk: DIASource CEA-IRMA kit

B. Catalogusnummer: KIP0331: 96 testen

C. Geproduceerd door: DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Carcino-embryonaal Antigeen (CEA)

CEA is een oncofoetaal glycoproteïne van 200.000 dalton door normale weefsels afgegeven tijdens de eerste zes maanden van het foetale leven. Later wordt de normale expressie van CEA door normale cellen grotendeels onderdrukt behalve in kankerweefsels van verschillende celtypes, die grote hoeveelheden van dit oncofoetale proteïne in circulatie kunnen brengen. Algemeen aanvaard als een nuttige hulp voor het opvolgen van het verloop van kankerziekten, mag CEA niet bekeken worden als een tumor-specifieke marker omdat het nog in kleine hoeveelheden wordt afgescheiden door sommige normale weefsels tijdens het volwassen leven, met kleine verhogingen van het niveau in serum in geval van goedaardige ziekten als cirrose, hepatitis, ontstekingen van de ingewanden, renaal falen en bij hevige rokers. Daarom moet de bepaling van de concentratie van CEA in serum voor diagnostische doeleinden met grote voorzichtigheid behandeld worden.

B. Klinische toepassingen

· Opvolgen van kankerziekten

Als de concentratie van CEA in serum bepaald wordt voor enige therapie, is het één van de beste parameters om de evolutie van kanker te volgen na chirurgie, chemotherapie, etc... Na remissie blijken CEA spiegels vaak een goede screeningtest voor vroege detectie van recurrentie van de tumor.

· Diagnostische hulp bij kanker

Hoewel ze niet specifiek zijn voor kanker onder 20 ng/ml, zijn CEA spiegels boven deze limiet een sterke indicatie van kwaadaardigheid (minder dan 0.5% onterecht positief).

· Hulp bij de prognose van kanker

CEA spiegels in serum geven belangrijke prognostische informatie omdat er een rechtstreekse relatie is vastgesteld tussen de concentratie van CEA in serum en de classificatie van Dukes in coloncarcinoom. Dezelfde relatie bestaat waarschijnlijk ook bij borstkanker en longkanker waar hoge CEA spiegels bijna exclusief voorkomen in geval van gedissemineerde metastase.

IV. *BESCHRIJVING VAN DE METHODE*

CEA-Irma van DIASource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de buizen zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ¹²⁵I, zal het systeem vervollledigen en de immunologische reactie teweegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis de antigeenconcentratie weer. Door het gebruik van meerdere verschillende Mabs wordt hyperspecificiteit vermeden, die gebruikelijk is voor IRMA met 2 Mabs, en is een schudder of een lange incubatie bij 37°C niet nodig.

V. *GELEVERDE REAGENTIA*

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 Buizen gecoat met anti-INS (monoklonale antilichamen)	2 x 48	violet	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: Anti-INS (monoklonale antilichamen) gelabeld met ¹²⁵ jood in fosfaat buffer met bovien serumalbumine, azide (< 0,1%) , EDTA en een inerte rode kleurstof	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 5,5 ml 440 kBq	rood	Klaar voor gebruik	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Specimen diluent in humaan plasma en thymol	DIL	SPE	1 vial gevries- droogd	zwart	gedestilleerd water toevoegen (zie exacte hoeveelheid op het etiket)	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 0 tot 5 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in humaan plasma en thymol	CAL	N	6 flacons, gevries- droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 of 2 in humaan plasma en thymol	CONTROL	N	2 flacons, gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Opmerking: 1. Gebruik Specimen Diluent voor monsterverdunningen.
 2. 1 IE van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 IE van het 1^{se} IRP van humaan CEA 73/601.
 3. 1 IU van de kalibrator is equivalent voor 100 ng

VI. *NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN*

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 µl, 100 µl, 500 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Pipet voor toevoeging van 5 tot 10 ml gedestilleerd water.
4. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
5. Afzuigsysteem (facultatief).
6. Vortexmenger.
7. Magnetische roerder.
8. Incubator bij 37°C.
9. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. *BEREIDING VAN HET REAGENS*

A. Kalibrators: Reconstitueer de kalibratoren met 1,0 ml gedestilleerd water.
B. Controles: Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.

C. Werk-wasoplossing: Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x).
Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.
D. Verdunner : Reconstitueer de verdunner met de hoeveelheid gedestilleerd water zoals vermeld op het etiket.

VIII. *OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA*

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.

- Na reconstitutie van de kalibrators en de controles moeten aliquots gemaakt worden en bewaard bij –20°C voor maximum 3 maanden.

- De gereconstitueerde specimenverdunner is stabiel voor 8 weken bij 2 tot 8°C.

- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.

- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.

- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. *MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING*

- Serum moeten bij 2 tot 8°C bewaard worden.

- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.

- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien

- Gebruik geen plasma monsters.

X. *PROCEDURE*

A. Opmerkingen bij de procedure
Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

1. Etiketeer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketeer 2 normale tubes voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 100 µl van elk in de desbetreffende tube.
3. Pipetteer 50 µl van de tracer in elke tube.
4. Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 2 uur bij 37°C.
6. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuinvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
9. Was de buizen nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer)
10. Na de laatste wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
11. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. *BEREKENING VAN DE RESULTATEN*

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige CEA -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier

- en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
- Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
 - Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

CEA-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		216032	100
Kalibrator	0,0 ng/ml	679	
	2,0 ng/ml	1581	0,42
	6,0 ng/ml	3621	1,36
	20,0 ng/ml	8620	3,68
	60,0 ng/ml	23790	10,70
	200,0 ng/ml	64556	29,57

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

- A. Detectielimiet**
Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,17 ng/ml.
- B. Specificiteit**
De kruisreactiviteit met de normale kruisreagerende antigenen NCA & NCA-2 en mal-CEA & mbp-CEA werd geëvalueerd. Serum monsters werden gespiked met verschillende hoeveelheden NCA, NCA-2, mal-CEA of mbp-CEA zoals getoond in de tabel hieronder.
Kruisreactiviteit met NCA is een gekend fenomeen dat ook vastgesteld wordt bij andere CEA testen (zie NEQAS rapport Commentaren voor CEA. Distributie 65. 1993.)

Monster	samenstelling	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
C051	-	-	2,3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2,3	5,7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2,3	6,6
C066	-	-	5,9
C076	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L)	15,9	15,8
C068	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15,9	18,5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5,9	6,9
C081	-	-	3,7
C082	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3,7	3,5
C087	+ CEA (73/603 at 100 U/L)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbp-CEA	14	14,3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49,6

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC(%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	20	12,2 ± 0,3	2,3	A	20	5,3 ± 0,4	7,4
B	20	22,8 ± 0,8	3,1	B	20	21,4 ± 1,1	5,1

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST			
Monster	Toegevoegd CEA (ng/ml)	Recovery van CEA (ng/ml)	Recovery (%)
A	5	4,7	94,0
	12,5	11,1	88,8
	35	30,9	88,3
	50	45,5	91,0
	100	98,4	98,4

VERDUNNINGSTEST			
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
1	1/1	195.2	195.2
	1/2	97.6	100.1
	1/4	48.8	57.2
	1/8	24.4	30.2
	1/16	12.2	13.6
	1/32	6.1	7.0
	1/64	3.1	3.4
	1/128	1.5	2.8
2	1/1	164.8	164.8
	1/2	82.4	89.7
	1/4	41.2	52.2
	1/8	20.6	25.6
	1/16	10.3	11.0
	1/32	5.2	6.4
	1/64	2.6	3.5
	1/128	1.3	1.1

De monsters zijn verdund met specimenverdunner.

- F. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster**
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate tubes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7,8	8,1	8,0	8,0
S 2 (ng/ml)	27,0	26,4	26,7	25,8

- G. "Hook"-effect**
Een “Hook”-effect kan worden waargenomen boven 25000 ng/ml CEA.

XIV. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays.
Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben.
Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.

- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdooien.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

% DISTRIBUTIE VAN CEA WAARDEN					
	Aantal	0-3,0 ng/ml	3,1-5,0 ng/ml	5,1-10,0 ng/ml	> 10 ng/ml
Gezond					
Niet-rokers	110	96,4	2,7	0,9	0
Rokers	64	78,1	10,9	7,8	3,1
TOTAAL	174	89,7	5,7	3,4	1,1
Niet-kwaadaardig					
Cirroze	37	29,7	13,5	37,8	18,9
Crohn	26	88,5	7,7	0	3,8
Kwaadaardig					
Colorectaal	58	31,0	6,9	10,3	51,7
Borst	50	60,0	14,0	10,0	16,0
Maag	61	42,6	8,2	13,1	36,1
Long	50	30,0	12,0	22,0	36,0
Eierstokken	50	84,0	2,0	8,0	6,0

XVII. VOORZORGSMATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVIII. BIBLIOGRAFIE

- BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38
- BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187
- GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the guman digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481
- HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal. gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140
- LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal. mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609
- National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375
- RODGERS G.T., 1976
Heterogeinity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373
- STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (ml)	KALIBRA- TORS (ml)	MONSTER(S) (ml)
Kalibrators (0 -5) Monsters Tracer	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Incubatie	2 uur bij 37°C		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

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

CEA-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'Antigene Carcino-Embrionario (CEA) nel siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource CEA-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0331: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Antigene Carcinoembrionario (CEA)

Il CEA è una glicoproteina oncofetale, di peso molecolare pari a 200.000 Dalton, prodotta dai tessuti normali durante i primi mesi della vita fetale. Successivamente, la produzione di CEA da parte delle cellule normali va ampiamente riducendosi. Al contrario, tessuti tumorali di diversa tipologia cellulare possono secernere nel flusso sanguigno grandi quantità di tale proteina oncofetale. Ampiamente riconosciuto come valido supporto aggiuntivo per il monitoraggio di patologie tumorali, il CEA non può essere considerato come marker tumore-specifico dal momento che, in età adulta, viene comunque prodotto in piccole quantità da alcuni tessuti normali, con lievi aumenti dei suoi livelli nel siero in caso di patologie benigne quali cirrosi, epatite, malattie infiammatorie intestinali, insufficienza renale e nei fumatori accaniti. I risultati della misurazione nel siero dei livelli di CEA a scopo diagnostico devono essere pertanto valutati con assoluta cautela.

B. Applicazioni cliniche

Monitoraggio di patologie neoplastiche

Quando determinati prima di qualsiasi tipo di intervento terapeutico, i livelli di CEA nel siero costituiscono uno dei parametri più utili per il monitoraggio dell'evoluzione della malattia in fase postoperatoria, chemioterapia, ecc. Dopo remissione, il dosaggio CEA risulta essere spesso un valido test di screening per l'identificazione precoce di recidive.

Supporto diagnostico per patologie neoplastiche

Sebbene non indicativi di neoplasia quando aumentati fino a un massimo di 20 ng/ml, livelli di CEA superiori a tale limite sono altamente suggestivi di malignità (falsi positivi < 0,5%).

Supporto prognostico per patologie neoplastiche

La determinazione dei livelli di CEA nel siero fornisce importanti informazioni prognostiche sulla base della correlazione diretta stabilita tra concentrazioni di CEA nel siero e classificazione di Dukes nel colon. Lo stesso tipo di correlazione esiste probabilmente anche nel caso del carcinoma mammario e del carcinoma polmonare, patologie per le quali il riscontro di livelli di CEA molto elevati è associabile quasi esclusivamente alla presenza di metastasi disseminate.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource CEA-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione in provette preadsorbite. L’anticorpo di cattura Mab1 è preadsorbito sulla superficie interna della parte inferiore di provette di plastica. I calibratori e i campioni distribuiti nelle provette mostrano inizialmente una bassa affinità per il Mab1. L’aggiunta di Mab2, un anticorpo di segnale marcato con ¹²⁵I, completa il sistema innescando la reazione immunologica. Una volta effettuato il lavaggio, la radioattività residua all’interno delle provette riflette la concentrazione dell’antigene. L’impiego di alcuni Mabs diversi tra loro evita il rischio di iperspecificità comune ai sistemi IRMA a due siti , nonché l’obbligo di utilizzo di agitatori e lunghi tempi di incubazione a 37°C.

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti CEA (anticorpi monoclonali)	2 x 48	viola	Pronte per l'uso
Ab ¹²⁵I Anti-CEA-¹²⁵I (anticorpo monoclonale) in tampone fosfato con albumina di siero bovino, azide (<0,1%), EDTA e un colorante rosso inerte	1 flacone 5,5 ml 440 kBq	Rosso	Pronte per l'uso
DIL SPE Diluyente per campioni in plasma umano con timolo	1 flacone liofiliz.	nero	Aggiungere Acqua distillata (quantità esatta indicata sull'etichetta del flacone).
CAL N Calibratore 0-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano, contenente timolo.	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano, contenente timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Note: 1. Per la diluizione dei campioni di siero, utilizzare il contenuto delle fiale del diluente.
2. 1 UI del calibratore è equivalente a 1 UI del 1° IRP di CEA umano 73/601.
1 UI del calibratore equivale a 100 ng.

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1000 µl (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Pipetta per distribuzione di 5-10 ml di acqua distillata.
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico
6. Incubazione a 37°C.
7. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi. tipo Cornwall)
8. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
9. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore** : Ricostituire i calibratori 0-5 con 1,0 ml di acqua distillata.
- B. **Controls** : Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- A. **C. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.
- D. **Diluente:** Ricostituire il diluente con la quantità di acqua distillata indicata sull’etichetta del flacone.

CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, i calibratori e i controlli dovranno essere suddivisi in aliquote e conservati a -20°C per un massimo di 3 mesi.
- Dopo ricostituzione, il diluente dei campioni rimane stabile per 8 settimane a 2-8°C.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull’etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell’aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Il siero deve essere conservato a 2-8°C.
- Se il test non viene eseguito entro 24 ore, si consiglia la conservazione a - 20°C.
- Evitare successivi congelamenti e scongelamenti.
- Non utilizzare campioni di plasma.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell’uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
L’uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

- B. **Metodo del dosaggio**
1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell’attività totale.

2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 100 µl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.

3. Dispensare 50 ul di marcato anti-CEA¹²⁵I in ciascuna provetta, comprese quelle non preadsorbite per l’attività totale.

4. Agitare manualmente con delicatezza il portaprovette in modo da eliminare eventuali bolle d’aria.

5. Incubare 120 minuti a 37°C.

6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l’attività totale, facendo attenzione che il puntale dell’aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.

7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.

8. Aspirare (o decantare)il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l’attività totale.

9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).

10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.

2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di CEA. Scartare i duplicati palesemente discordanti.

3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.

4. E’ possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

CEA-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		216032	100
Calibratore	0,0 ng/ml	679	
	2,0 ng/ml	1581	0,42
	6,0 ng/ml	3621	1,36
	20,0 ng/ml	8620	3,68
	60,0 ng/ml	23790	10,70
	200,0 ng/ml	64556	29,57

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Dodici replicati dello calibratore zero sono stati dosati insieme agli altri calibratore.
Il limite di rilevazione, definito come concentrazione apparente più due deviazioni standard, del valore di cpm medio dello calibratore zero, è risultato pari a 0,17 ng/ml.

B. Specificità

E’ stata valutata la reattività crociata utilizzando i normali antigeni cross-reagenti NCA & NCA-2 e mal-CEA & mbp-CEA. Ai campioni di siero sono state aggiunte varie quantità di NCA, NCA-2, mal-CEA o mbp-CEA come da tabella.
La reattività crociata con NCA è un fenomeno noto che viene osservato anche con altri test CEA (vedi Rapporto NEQAS, Commenti su CEA. Distribuzione 65.1993)

Campione	Composizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Risultato CEA-IRMA (ng/ml)
C051	-	-	2,3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2,3	5,7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2,3	6,6
C066	-	-	5,9
C076	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L)	15,9	15,8
C068	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15,9	18,5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5,9	6,9
C081	-	-	3,7
C082	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3,7	3,5
C087	+ CEA (73/603 at 100 U/L)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbp-CEA	14	14,3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49,6

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	Replicato	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	Replicato	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	12,2 ± 0,3	2,3	A	20	5,3 ± 0,4	7,4
B	20	22,8 ± 0,8	3,1	B	20	21,4 ± 1,1	5,1

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

RECOVERY TEST		
CEA aggiunta (ng/ml)	CEA recuperata (ng/ml)	Recupero (%)
5	4,7	94,0
12,5	11,1	88,8
35	30,9	88,3
50	45,5	91,0
100	98,4	98,4

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
1	1/1	195,2	195,2
	1/2	100,1	97,6
	1/4	57,2	48,8
	1/8	30,2	24,4
	1/16	13,6	12,2
	1/32	7,0	6,1
	1/64	3,4	3,1
	1/128	2,8	1,5
2	1/1	164,8	164,8
	1/2	89,7	82,4
	1/4	52,2	41,2
	1/8	25,6	20,6
	1/16	11,0	10,3
	1/32	6,4	5,2
	1/64	3,5	2,6
	1/128	1,1	1,3

I campioni sono stati diluiti con diluente per campioni.

E. Intervallo di tempo tra distribuzione dell’ultimo calibratore e campioni

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

TEMPO TRASCORSO				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7,8	8,1	8,0	8,0
S 2 (ng/ml)	27,0	26,4	26,7	25,8

F. Effetto hook

Per concentrazioni di CEA superiori a 25000 ng/ml è osservabile un “effetto gancio”.

XIV. LIMITAZIONI

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

XV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

% DISTRIBUZIONE DEI VALORI CEA					
	Numero	0-3,0 ng/ml	3,1-5,0 ng/ml	5,1-10,0 ng/ml	> 10 ng/ml
Sani					
Non-fumatori	110	96,4	2,7	0,9	0
Fumatori	64	78,1	10,9	7,8	3,1
TOTALE	174	89,7	5,7	3,4	1,1
Non-maligno					
Cirrosi	37	29,7	13,5	37,8	18,9
Crohn	26	88,5	7,7	0	3,8
Maligno					
Colorettale	58	31,0	6,9	10,3	51,7
Mammario	50	60,0	14,0	10,0	16,0
Gastrico	61	42,6	8,2	13,1	36,1
Polmonare	50	30,0	12,0	22,0	36,0
Ovarico	50	84,0	2,0	8,0	6,0

XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.
L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38

2. BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187

3. GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481

4. HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140

5. LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal. mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609

6. National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375

7. RODGERS G.T., 1976
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373

8. STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	CAMPIONI ml
Calibratore (0-5) Campioni Marcato	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Incubazione	120 minuti a 37°C		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio Separazione	- - - - -	Aspirare (o decantare) 2,0 aspirare (o decantare) 2,0 aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Leer el protocolo completo antes de usar.

CEA-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del antígeno carcinoembrionario (CEA) humano en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource CEA-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP0331 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Antígeno Carcinoembrionario (CEA)

CEA es una glicoproteína oncofetal de 200.000 Dalton expresada en tejidos normales durante los seis primeros meses de la vida fetal. Después, la expresión del CEA por células normales es en gran parte reprimida, excepto en tejidos cancerosos de varios tipos de células, que pueden segregar cantidades grandes de esta proteína oncofetal en la circulación. El CEA es generalmente aceptado como una ayuda útil para observar la evolución de enfermedades cancerosas, pero no puede ser considerado como un marcador tumor-específico porque aún es segregado en cantidades pequeñas por algunos tejidos normales en la vida adulta, con aumentos pequeños del nivel en suero en caso de enfermedades benignas como cirrosis, hepatitis, enfermedades inflamatorias intestinales, falla renal y fumadores empedernidos. Por eso, la medición de la concentración del CEA en el suero para fines diagnósticos se debe interpretar con precaución.

B. Aplicaciones clínicas

· *Seguimiento de enfermedades cancerosas*

Si la concentración del CEA en suero es medida antes de alguna terapia, es un parámetro excelente para seguir la evolución del cáncer después de cirugía, quimioterapia, etc... Después de la remisión, los niveles de CEA aparecen un buen test "screening" para la detección temprana de la recurrencia del tumor.

· *Ayuda diagnóstica en cáncer*

Niveles del CEA por encima de 20 ng/ml son una indicación importante para la malignidad (menos del 0.5% de casos positivos falsos), aunque no son específicos del cáncer si están por debajo de este límite.

· *Ayuda pronóstica en cáncer*

Los niveles del CEA en suero proporcionan información pronóstica importante debido a la relación directa entre la concentración del CEA en suero y la clasificación de Dukes de los tumores de colon. La misma relación existe probablemente en el carcinoma mamario y en el carcinoma pulmonar, que presentan niveles muy elevados del CEA casi exclusivamente en casos de metástasis diseminada.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

CEA-Irma de DIASource es un radioinmunoensayo basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte interior de las paredes del tubo de poliestireno. Al principio calibradores o muestras añadidos en los tubos presentarán poca afinidad con Mabs1. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ¹²⁵I, completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno. El uso de varios Mabs distintos evita hiperspecificidad, propio de IRMA dos-puntos, y el uso de un agitador o la incubación larga a 37°C.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti CEA (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	violeta	Listo para uso
Ab ¹²⁵I TRAZADOR: anti-CEA(anticuerpos monoclonales) marcado con I125 en tampón fosfato con albumina bovina, azida (<0.1%), EDTA y un colorante rojo inerte	1 vial 5.5 ml 440 kBq	rojo	Listo para uso
DIL SPE Diluyente de Muestra en plasma humano y thymol	1 vial liofilizados	negro	Añadir agua destilada (ver cantidad exacta en la etiqueta)
CAL N Calibradores N = 0 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en plasma humano y thymol	6 viales lío­filizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 y 2 en plasma humano, thymol y benzamidina	2 viales lío­filizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: 1. Para diluciones de muestras utilizar Diluyente de muestra.
2. 1 UI de la preparación del calibrador es equivalente a 1 UI del 1^{er} IRP del CEA humano 73/601.
3. 1 UI del calibrador es equivalente a 100 ng.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50µl, 100µl, 500µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Una pipeta para la dispensación de 5 a 10 ml de agua destilada
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Incubador a 37°C
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 1,0 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.
- D. **Diluyente :** Reconstituir el diluyente con la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de la reconstitución de las muestras y de los controles, alicuatoy y guardar a –20°C como mucho 3 meses.
- El diluyente reconstituido es estable durante 8 semanas a 2-8°C.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

X. PROTOCOLO

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

- B. **Protocolo**
 1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 100 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 3. Dispensar 50 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos, destinados a las Cuentas Totales.
 4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
 5. Incubar durante 2 horas a 37°C.
 6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
 8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
 9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
 10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
 11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

- 1. Calcular la media de los duplicados.
- 2. Representar en un gráfico semilogarítmico o linear el c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de CEA (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
- 3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
- 4. Métodos computarizados de proceso de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

CEA-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		216032	100
Calibrador	0,0 ng/ml	679	
	2,0 ng/ml	1581	0,42
	6,0 ng/ml	3621	1,36
	20,0 ng/ml	8620	3,68
	60,0 ng/ml	23790	10,70
	200,0 ng/ml	64556	29,57

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.
El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,17 ng/ml.

B. Especificidad

La reacción cruzada con los antígenos normales reaccionando de manera cruzada NCA & NCA-2 y mal-CEA & mbp-CEA fue evaluada. Muestras de suero fueron enriquecidas con varias cantidades de NCA, NCA-2, mal-CEA o mbp-CEA como se ve en la tabla siguiente.
La reacción cruzada con NCA es un fenómeno conocido que se observa también en otros ensayos con CEA (ver NEQAS comentarios del informe para el CEA. Distribución 65. 1993.)

Muestra	composición	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
C051		-	2,3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2,3	5,7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2,3	6,6
C066	-	-	5,9
C076	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L)	15,9	15,8
C068	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15,9	18,5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5,9	6,9
C081	-	-	3,7
C082	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3,7	3,5
C087	+ CEA (73/603 at 100 U/L)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbp-CEA	14	14,3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49,6

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	12,2 ± 0,3	2,3	A	20	5,3 ± 0,4	7,4
B	20	22,8 ± 0,8	3,1	B	20	21,4 ± 1,1	5,1

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
1	1/1	195,2	195,2
	1/2	100,1	97,6
	1/4	57,2	48,8
	1/8	30,2	24,4
	1/16	13,6	12,2
	1/32	7,0	6,1
	1/64	3,4	3,1
	1/128	2,8	1,5
2	1/1	164,8	164,8
	1/2	89,7	82,4
	1/4	52,2	41,2
	1/8	25,6	20,6
	1/16	11,0	10,3
	1/32	6,4	5,2
	1/64	3,5	2,6
	1/128	1,1	1,3

Las muestras fueron diluidas con el Diluyente de la muestra.

TEST DE RECUPERACIÓN			
Muestra	CEA añadido (ng/ml)	CEA Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
A	5	4,7	94,0
	12,5	11,1	88,8
	35	30,9	88,3
	50	45,5	91,0
	100	98,4	98,4

- E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra
Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7,8	8,1	8,0	8,0
S 2 (ng/ml)	27,0	26,4	26,7	25,8

- F. Efecto “hook”
Se observa un efecto "gancho" sobre 25000 ng/ml de CEA.

XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnostico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro.

Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

% DISTRIBUCIÓN DE VALORES DE CEA					
	Número	0-3,0 ng/ml	3,1-5,0 ng/ml	5,1-10,0 ng/ml	> 10 ng/ml
Sano					
No fumadores	110	96,4	2,7	0,9	0
Fumadores	64	78,1	10,9	7,8	3,1
TOTAL	174	89,7	5,7	3,4	1,1
No-maligno					
Cirrosis	37	29,7	13,5	37,8	18,9
Crohn	26	88,5	7,7	0	3,8
Maligno					
Colorectal	58	31,0	6,9	10,3	51,7
Mamario	50	60,0	14,0	10,0	16,0
Gástrico	61	42,6	8,2	13,1	36,1
Pulmonar	50	30,0	12,0	22,0	36,0
Ovárico	50	84,0	2,0	8,0	6,0

XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de

lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

1.

BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38

2.

BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187

3.

GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481

4.

HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140

5.

LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609

6.

National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375

7.

RODGERS G.T., 1976
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373

8.

STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADO RES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	100	-
Muestras, controles	-	-	100
Trazador	50	50	50
Incubación	2 horas a 37°C		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

CEA-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση του ανθρώπινου καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ CEA-IRMA της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP0331: 96 εξετάσεις
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)

Το CEA είναι μια ογκοεμβρυϊκή γλυκοπρωτεΐνη 200.000 Dalton, η οποία εκφράζεται από τους φυσιολογικούς ιστούς κατά τη διάρκεια των πρώτων έξι μηνών της ζωής του εμβρύου. Αργότερα, η έκφραση του CEA από φυσιολογικά κύτταρα καταστέλλεται σε μεγάλο βαθμό εκτός από τους καρκινικούς ιστούς διαφόρων τύπων κυττάρων, οι οποίοι ενδέχεται να απεκκρίνουν στην κυκλοφορία μεγάλες ποσότητες αυτής της ογκοεμβρυϊκής πρωτεΐνης. Ευρέως αποδεκτό ως χρήσιμο βοήθημα για την παρακολούθηση διαφόρων καρκινικών νόσων, το CEA δε θα πρέπει να θεωρείται ως δείκτης ειδικός για όγκους διότι εξακολουθεί να απεκκρίνεται σε μικρές ποσότητες από μερικούς φυσιολογικούς ιστούς κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, με μικρές αυξήσεις των επιπέδων στον ορό σε καλοήθεις νόσους όπως είναι η κίρρωση, η ηπατίτιδα, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, νεφρική ανεπάρκεια και σε άτομα που καπνίζουν πολύ. Επομένως, η μέτρηση της συγκέντρωσης του CEA στον ορό για διαγνωστικούς σκοπούς πρέπει να λαμβάνεται υπόψη με μεγάλη προσοχή.

B. Κλινικές εφαρμογές

· Παρακολούθηση καρκινικών νόσων

Όταν μετράται πριν από οποιαδήποτε θεραπεία, η συγκέντρωση του CEA στον ορό είναι μια από τις καλύτερες παραμέτρους για την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου μετά από χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, κ.λπ. Μετά από ύφεση, τα επίπεδα του CEA φαίνονται συχνά ως καλό μέσο ελέγχου για την πρόωμη ανίχνευση υποτροπής.

· Διαγνωστικό βοήθημα για τον καρκίνο

Παρότι δεν είναι ειδικά για τον καρκίνο αν η αύξησή τους είναι κάτω από τα 20 ng/ml, τα επίπεδα του CEA πάνω από το όριο αυτό υποδηλώνουν μεγάλη πιθανότητα κακοήθειας (ποσοστό μικρότερο από 0,5% ψευδώς θετικό).

· Προγνωστικό βοήθημα για τον καρκίνο

Τα επίπεδα του CEA στον ορό προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες πρόγνωσης επειδή έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει άμεση σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του CEA στον ορό και την κατά Dukes ταξινόμηση στο κόλον. Η ίδια σχέση πιθανώς υπάρχει επίσης στο καρκίνωμα του μαστού και το καρκίνωμα του πνεύμονα όπου πολύ υψηλά επίπεδα CEA εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε περίπτωση διάσπαρτης μετάστασης.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση CEA-IRMA της DAsource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια δείχνουν κατ' αρχήν χαμηλή συγγένεια προς τα Mabs1. Προσθήκη Mab2, του αντισώματος σηματοδότησης, που είναι σημασμένο με ¹²⁵I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Η χρήση αρκετών διακριτών Mabs αποφεύγει την υπερειδικότητα, που είναι συνήθης σε IRMA δύο σημείων, καθώς και την ανάγκη συσκευής ανάδευσης ή μακράς επώασης στους 37° C.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωμα- τικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι- CEA (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	ιόχρουν	Έτοιμο για χρήση
Ab ¹²⁵I Αντι-CEA (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ¹²⁵I σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES με βόεια ορολευκωματίνη, αζίδιο (<0,1%), EDTA και αδρανής κόκκινη χρωστική	1 φιαλίδιο 5.5 ml 440 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
DIL SPE Αραιωτικό δείγματος σε ανθρώπινο πλάσματος με θυμόλη	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	μαύρο	Προσθέστε απεσταγμένο νερό (δείτε την ακριβή ποσότητα στην ετικέτα του φιαλιδίου)
CAL N Βαθμονομητές 0-5 σε ανθρώπινο πλάσματος με θυμόλη (δείτε ακριβή τιμή πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	6 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 1,0 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Υλικά ελέγχου 1 και 2 σε ανθρώπινο πλάσματος και θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλ.	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιήστε το περιεχόμενο των φιαλιδίων με το αραιωτικό για αραιώσεις ορών.
2. 1 IU του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 IU του 1^{ου} IRP του ανθρώπινου CEA 73/601.
1 IU του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 100 ng

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 500 μl και 1000 μl (συνιστάται η χρήση πιπετών ακρίβειας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πιπέτα για διανομή 5 έως 10 ml απεσταγμένου νερού
- Αναμεικτής στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Επωαστήρας στους 37° C
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές 0-5 με 1,0 ml απεσταγμένου νερού.
- Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.
- Αραιωτικό:** Ανασυστήστε το αραιωτικό με την ποσότητα απεσταγμένου νερού που αναφέρεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση των βαθμονομητών και των υλικών ελέγχου, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20° C επί 3 μήνες το μέγιστο.
- Το ανασυσταθέν αραιωτικό δείγματος παραμένει σταθερό επί 8 εβδομάδες σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

- Διαδικασία**
 - Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
 - Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 100 μl από έκαστο στα αντίστοιχα σωληνάρια.
 - Διανείμετε 50 μl ιχνηθέτη αντι-CEA-¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις συνολικές μετρήσεις.
 - Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
 - Επώαστε για 2 ώρες στους 37° C.
 - Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 - Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
 - Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).

9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
11. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

CEA-IRMA		cpm	B)
Συνολική μέτρηση		216032	100
Βαθμονομητής	0,0 ng/ml	679	
	2,0 ng/ml	1581	
	6,0 ng/ml	3621	0,42
	20,0 ng/ml	8620	1,36
	60,0 ng/ml	23790	3,68
	200,0 ng/ml	64556	10,70
			29,57

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης**
Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση της μέσης μέτρησης σε μηδενική δέσμευση συν δύο τυπικές αποκλίσεις, ήταν 0,17 ng/ml.
- B. Ειδικότητα**
Αξιολογήθηκε η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τα φυσιολογικά εμφανίζοντα διασταυρούμενη αντιδραστικότητα αντιγόνα NCA & NCA-2 και mal-CEA & mbr-CEA. Δείγματα ορού εμβολιάστηκαν με διάφορες ποσότητες NCA, NCA-2, mal-CEA ή mbr-CEA, όπως φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα.
Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με το NCA είναι γνωστό φαινόμενο, το οποίο παρατηρείται επίσης και με άλλους προσδιορισμούς CEA (δείτε την έκθεση NEQAS - Σχόλια για το CEA. Διάθεση 65. 1993.)

Δείγμα	Σύνθεση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Αποτέλεσμα CEA-IRMA (ng/ml)
C051	-	-	2,3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2,3	5,7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2,3	6,6
C066	-	-	5,9
C076	C066 + CEA (73/603 στα 100 U/l)	15,9	15,8
C068	C066 + CEA (73/603 στα 100 U/l) + NCA-2 (82 ng/ml)	15,9	18,5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5,9	6,9
C081	-	-	3,7
C082	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3,7	3,5
C087	+ CEA (73/603 στα 100 U/l)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbr-CEA	14	14,3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49,6

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	Replicate	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	Replicate	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	12,2 ± 0,3	2,3	A	20	5,3 ± 0,4	7,4
B	20	22,8 ± 0,8	3,1	B	20	21,4 ± 1,1	5,1

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

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ		
Προσθεθέν CEA (ng/ml)	Ανακτηθέν CEA (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
5	4,7	94,0
12,5	11,1	88,8
35	30,9	88,3
50	45,5	91,0
100	98,4	98,4

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
1	1/1	195.2	195.2
	1/2	97.6	100.1
	1/4	48.8	57.2
	1/8	24.4	30.2
	1/16	12.2	13.6
	1/32	6.1	7.0
	1/64	3.1	3.4
	1/128	1.5	2.8
	1/1	164.8	164.8
	1/2	82.4	89.7
2	1/4	41.2	52.2
	1/8	20.6	25.6
	1/16	10.3	11.0
	1/32	5.2	6.4
	1/64	2.6	3.5
	1/128	1.3	1.1

Τα δείγματα αραιώθηκαν με αραιωτικό δειγμάτων.

- E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος**
Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7,8	8,1	8,0	8,0
S 2 (ng/ml)	27,0	26,4	26,7	25,8

- ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)**
Ένα φαινόμενο αγκίστρου (Hook effect) μπορεί να παρατηρηθεί πάνω από 25000 ng/ml CEA

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντι-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν

- ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού. Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

XVI. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του φυσιολογικό πεδίο τιμών.

% ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ CEA					
	σφάλματο ς	0-3,0 ng/ml	3.1-5,0 ng/ml	5.1-10,0 ng/ml	> 10 ng/ml
Υγιείς					
Μη καπνιστές	110	96,4	2,7	0,9	0
Καπνιστές	64	78,1	10,9	7,8	3,1
ΣΥΝΟΛΟ	174	89,7	5,7	3,4	1,1
Μη κακοήθεις					
Κίρρωση	37	29,7	13,5	37,8	18,9
Crohn	26	88,5	7,7	0	3,8
Κακοήθεις					
Κόλου-ορθού					
Μαστού	58	31,0	6,9	10,3	51,7
Στομάχου	50	60,0	14,0	10,0	16,0
Πνεύμονα	61	42,6	8,2	13,1	36,1
Ωοθηκών	50	30,0	12,0	22,0	36,0
	50	84,0	2,0	8,0	6,0

XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*. Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵ I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα. Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HbsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας. Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά. Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου. Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλωσίμα γάντια.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38
- BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187
- GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the guman digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481
- HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140
- LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal. mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609
- National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375
- RODGERS G.T., 1976
Heterogeinity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373
- STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ml	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ ΤΕΣ ml	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ml
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα Ιχνηθέτης	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Επώαση	2 ώρες στους 37° C		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	- -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	- -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

CEA-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoradiometryczne do ilościowego pomiaru ludzkiego antygenu karcyno-embryonalnego (Carcino Embryonic Antigen - CEA) w surowicy metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIAsource CEA-IRMA Kit
- B. **Numer katalogowy:** KIP0331: 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Antygen karcyno-embryonalny (CEA)

CEA jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 200000 Daltonów wytwarzaną w prawidłowych tkankach w pierwszych sześciu miesiącach życia płodowego. W późniejszym okresie życia, ekspresja CEA jest hamowana, z wyjątkiem tkanek nowotworowych rozmaitego pochodzenia, które mogą wydzielać do krążenia duże ilości tego białka płodowego. Białko CEA, szeroko uznawane jako substancja przydatna do monitorowania przebiegu choroby nowotworowej, nie powinno być uznawane jako marker swoisty dla określonego rodzaju guza nowotworowego, ponieważ jest nadal wydzielane przez pewne prawidłowe tkanki w życiu dorosłych osobników, a do niewielkich wzrostów poziomów w surowicy dochodzi w chorobach niezłośliwych, takich jak marskość wątroby, zapalenie wątroby, choroby zapalne jelit, niewydolność nerek i u palaczy tytoniu. Dlatego, wyniki pomiarów stężenia CEA w surowicy dla celów diagnostycznych, muszą być interpretowane bardzo ostrożnie.

B. Zastosowania kliniczne

· **Monitorowanie chorób nowotworowych**

Stężenie CEA w surowicy oznaczane przed rozpoczęciem leczenia, jest najlepszym parametrem do monitorowania redukcji masy guza po leczeniu chirurgicznym, chemioterapii itp. Po remisji, oznaczanie poziomów CEA wydaje się być dobrym badaniem przesiewowym pod kątem wczesnego wykrycia nawrotu procesu nowotworowego.

· **Pomoc w rozpoznawaniu określonego nowotworu złośliwego**

Chociaż poziomy CEA nie są swoiste dla nowotworu, jeżeli nie przekraczają 20 ng/ml, wartości powyżej tej granicy silnie wskazują na występowanie procesu złośliwego (poniżej 0,5% wyników fałszywie dodatnich).

· **Pomoc w rokowaniu dotyczącym określonego nowotworu złośliwego**

Z uwagi na bezpośredni związek pomiędzy poziomami CEA w surowicy a klasyfikacją Duke'a w chorobach okrężnicy, poziomy CEA w surowicy dostarczają ważnych danych prognostycznych. Takie same powiązania występują prawdopodobnie również w raku sutka i płuca, w których bardzo wysokie poziomy CEA występują prawie wyłącznie w stadium rozsiałych przerzutów nowotworu.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Oznaczenie DIIAsource CEA-IRMA jest metodą immunoradiometryczną, opartą na separacji w opłaszczonych probówkach. Kalibratory lub próbki, dodawane do probówek, będą na początku wykazywały niskie powinowactwo do Mab1. Dodanie Mab2, przeciwciała sygnałowego oznakowanego ¹²⁵I zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przepłukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu. Stosowanie odmiennych Mab pozwala na uniknięcie nadmiernej czułości, powszechnie występującej w dwustronnych oznaczeniach IRMA, podobnie jak konieczności stosowania wytrząsarki lub długiej inkubacji w temperaturze 37°C.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
 Probówki opłaszczone przeciwciałami anty-CEA (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	fioletowy	Gotowe do zastosowania.
Ab ¹²⁵I (przeciwciała monoklonalne) anty-CEA- ¹²⁵ I w buforze fosforanowym z albuminą z surowicy bydlęcej, azydkiem (<0,1%), EDTA i czerwonym barwnikiem obojętnym	1 fiolka 5,5 ml 440 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania.
DIL SPE Rozcieńczalnik próbki w osocza pochodzenia ludzkiego z tymolem	1 fiolka liofil.	czarny	Dodać wody destylowanej (dokładne wartości znajdują się na etykietach fiolek)
CAL N Kalibratory 0 - 5 w osocza pochodzenia ludzkiego z tymolem (dokładne wartości na etykietach fiolek)	6 fiolek liofil.	żółty	Dodać 1 ml wody destylowanej
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (TRIS-HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
CONTROL N Kontrola 1 i 2 w osocza pochodzenia ludzkiego z tymolem	2 fiolek liofil.	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: 1. Do rozcieńczeń surowicy należy wykorzystać zawartość fiolek z rozcieńczalnikiem.
2. 1 IU kalibratora jest równoważna do 1 IU ludzkiego Ist IRP CEA 73/601.
1 IU kalibratora jest równoważna do 100 ng

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

1. Woda destylowana
2. Pipety do dostarczania objętości: 50 µl, 100 µl, 500 µl i 1000 µl. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Pipeta do dostarczenia 5 - 10 ml wody destylowanej
4. Mieszadło wirowe
5. Mieszadło magnetyczne
6. Inkubator 37°C
7. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
8. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
9. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibratory:** Rekonstruować kalibratory 0-5 przy pomocy 1 ml wody destylowanej.
- B. **Kontrola:** Kontrola należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. **Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.
- D. **Rozcieńczalnik:** Rozpuścić rozcieńczalnik w niewielkiej ilości wody destylowanej (jak opisano na etykiecie fiolek).

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rozpuszczeniu kalibratorów i kontroli, niewielkie objętości tych substancji można przechowywać przez maksymalnie 3 miesiące w temperaturze -20°C.
- Rozpuszczony rozcieńczalnik próbki zachowuje stabilność przez 8 tygodni w temperaturze od 2 do 8°C.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

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

X. PROCEDURA

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

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczoną probówkę w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykle próbki.
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 100 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
3. Dodać 50 µl anty-CEA -¹²⁵I (znacznik izotopowy) do wszystkich probówek w tym do nieopłaszczonych probówek do całkowitego zliczania.
4. Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z probówkami, aby uwolnić wszelkie, uwięzione pęcherzyki powietrza.
5. Inkubować przez 2 godziny w 37°C.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki.
7. Przepłukać próbki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczającego należy unikać wytwarzania piany.
8. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania).
9. Ponownie przepłukać próbki przy pomocy 2 ml roztworu płuczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać)

10. Po ostatnim płukaniu, pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
11. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

CEA-IRMA	cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite	216032	100
Kalibrator	0,0 ng/ml	679
	2,0 ng/ml	1581
	6,0 ng/ml	3621
	20,0 ng/ml	8620
	60,0 ng/ml	23790
	200,0 ng/ml	64556
		0,42
		1,36
		3,68
		10,70
		29,57

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwanaście kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 0,17 ng/ml.

B. Swoistość

Określano reaktywność krzyżową z prawidłowymi antygenami reagującymi krzyżowo NCA i NCA-2 oraz mał CEA i mbp-CEA. Próbki surowicy były nasycone różnymi ilościami NCA, NCA-2, mał-CEA i mbp-CEA (jak pokazano w poniższej tabeli). Reaktywność krzyżowa na NCA jest znanym zjawiskiem, które jest również obserwowane w innych oznaczeniach CEA (szczegóły w Komentarzach dotyczących CEA NEQAS Wydanie 65. 1993.)

Próbka	Skład	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	wynik CEA-IRMA (ng/ml)
C051	-	-	2,3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2,3	5,7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2,3	6,6
C066	-	-	5,9
C076	C066 + CEA (73/603 przy 100 U/L)	15,9	15,8
C068	C066 + CEA (73/603 przy 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15,9	18,5
C069	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	5,9	6,9
C081	-	-	3,7
C082	C081 + 1 µg/ml Mał CEA	3,7	3,5
C087	+ CEA (73/603 przy 100 U/L)	-	14
C088	C087 + 8 µg/ml mbp-CEA	14	14,3
C089	C087 + 2 µg/ml NCA	14	49,6

C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	Oznaczenie powtórne	X ± S.D. (ng/ml)	CV %	Surowica	Oznaczenie powtórne	X ± S.D. (ng/ml)	CV %
A	20	12,2 ± 0,3	2,3	A	20	5,3 ± 0,4	7,4
B	20	22,8 ± 0,8	3,1	B	20	21,4 ± 1,1	5,1

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU		
CEA dodana (ng/ml)	CEA odzyskany (ng/ml)	Odzysk (%)
5	4,7	94,0
12,5	11,1	88,8
35	30,9	88,3
50	45,5	91,0
100	98,4	98,4

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzone (ng/ml)
1	1/1	195.2	195.2
	1/2	97.6	100.1
	1/4	48.8	57.2
	1/8	24.4	30.2
	1/16	12.2	13.6
	1/32	6.1	7.0
	1/64	3.1	3.4
	1/128	1.5	2.8
2	1/1	164.8	164.8
	1/2	82.4	89.7
	1/4	41.2	52.2
	1/8	20.6	25.6
	1/16	10.3	11.0
	1/32	5.2	6.4
	1/64	2.6	3.5
	1/128	1.3	1.1

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy rozcieńczalnika próbek

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

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

OPÓŹNIENIE				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7,8	8,1	8,0	8,0
S 2 (ng/ml)	27,0	26,4	26,7	25,8

F. Efekt hook'a

Efekt haka może być obserwowany ponad 25000 ng/ml CEA.

XIV. OGRANICZENIA

-
- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Probki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.
-
- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo ekspozowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich

nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Te wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych; każde laboratorium powinno opracować własne zakresy norm.

% DYSTRYBUCJI WARTOŚCI CEA					
	Liczba	0-3,0 ng/ml	3,1-5,0 ng/ml	5,1-10,0 ng/ml	> 10 ng/ml
Zdrowi osobnicy					
Niepalący	110	96,4	2,7	0,9	0
Palący	64	78,1	10,9	7,8	3,1
SUMA	174	89,7	5,7	3,4	1,1
Chorzy na choroby niezłośliwe					
Marskość wątroby	37	29,7	13,5	37,8	18,9
Choroba Crohn'a	26	88,5	7,7	0	3,8
Chorzy na choroby złośliwe					
Okreźnica/Odbytnica	58	31,0	6,9	10,3	51,7
Gruzoł sutkowy	50	60,0	14,0	10,0	16,0
Żółądek	61	42,6	8,2	13,1	36,1
Płuco	50	30,0	12,0	22,0	36,0
Jajnik	50	84,0	2,0	8,0	6,0

XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Tylko do diagnostyki *in vitro*.
Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).
Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.
Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.
Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewni wystarczające zabezpieczenie.
Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.
Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią

i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.
Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38
2. BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187
3. GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481
4. HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140
5. LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609
6. National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375
7. RODGERS G.T., 1976
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373
8. STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ ml	KALIBRATORY ml	PRÓBK(A)I ml
Kalibratory (0-5) Próbki Znacznik izotopowy	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Inkubacja	2 godziny w temperaturze 37°C		
Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie	- - - - -	aspiracja (lub odlewanie) 2,0 aspiracja (lub odlewanie) 2,0 aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie probówek przez 60 sekund		



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

CEA-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имунорадиометричен набор за количествени измервания *in vitro* на човешки карцино-ембрионален антиген (CEA) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource CEA-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP0331: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Карцино-ембрионален антиген (CEA)

CEA е онкофетален гликопротеин с размери 200 000 Далтона, който се експресираща от нормалните тъкани по време на първите шест месеца от феталния живот. По-късно експресирането на CEA от нормалните клетки се потиска в значителна степен с изключение на раковите тъкани от различни клетъчни типове, които могат да секретират големи количества от този онкофетален протеин в кръвообращението. Въпреки, че е широко разпространена употребата на CEA като полезен помощен лабораторен показател за мониториране хода на онкологично заболяване, все пак не бива да се счита за тумор-специфичен маркер, тъй като се секретира в малки количества от някои нормални тъкани при възрастни индивиди както и серумните му нива леко нарастват в случаите на доброкачествени заболявания като например цироза, хепатит, чревни възпалителни заболявания, бъбречна недостатъчност и при тежки пушачи. Ето защо, измерването на серумните концентрации на CEA за диагностични цели трябва да се третира с голямо внимание.

B. Клинично приложение

· Мониториране на онкологични заболявания

Когато бъде измерен преди началото на която и да е терапия, серумната концентрация на CEA е един от най-добрите показатели за мониториране еволюцията на рака след хирургична интервенция, химиотерапия и т.н. След ремисия нивата на CEA често се оказват един добър скринингов тест за ранно откриване на туморен рецидив.

· Диагностичен помощен показател при онкологично заболяване

Въпреки, че не е специфичен за онкологично заболяване когато нивата му са по-ниски от 20 ng/ml, CEA стойности над тази граница са изключително показателни за злокачественост (по-малко от 0.5% фалшиво положителни).

· Прогностичен помощен показател при онкологично заболяване

Серумните нива на CEA осигуряват важна прогностична информация, тъй като е установена директна връзка между серумните нива на CEA и дебелочревната класификация на Dukes. Същата взаимовръзка вероятно съществува при карцинома на млечната жлеза и белия дроб където много високи нива на CEA се наблюдават почти изключително при дисеминирани метастази.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource CEA-IRMA е имунорадиометрично изследване на база на сепарация на покрити епруветки. Mabs1 (моноклонални антитела 1), които са прихващащи антитела, са разположени по долната и вътрешната повърхност на пластмасовата епруветка. Калибраторите или пробите, които се добавят към епруветките отначало показват слаб афинитет към Mabs1. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антитела, маркирани с ¹²⁵I, завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация. Посредством употребата на няколко отделни Mabs се избягва свръхчувствителността, характерна за двучастовата IRMA, както и необходимостта от уред за разклащане или дълга инкубация при температура 37°C.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти			Количество в 96 теста	Цветен код	Приготвяне
 Епруветки, покрити с анти-CEA (моноклонални антитела)			2 x 48	лилав	Готов за употреба
Ab	125I		1 флакон 5.5 ml 440 kBq	червен	Готов за употреба
Анти-CEA- ¹²⁵ I (моноклонални антитела) антитела във фосфатен буфер със свински серумен албумин, азид (<0.1%), EDTA и инертна червена боя					
DIL	SPE		1 флакон лиофилизирани	черен	Добавете дестилирана вода (виж точното количество на етикета на флакона)
Разредител на пробата в човешки плазма с тимол					
CAL	N	Калибратор и 0-5 в	6 флакона лиофилизирани	жълт	Добавете 1 ml дестилирана вода
човешки плазма с тимол (виж точните стойности на етикетите на флаконите)					
WASH	SOLN	CONC	1 флакон 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
Измиващ разтвор (TRIS-HCl)					
CONTROL	N		2 флакона лиофилизирани	сребърен	Добавете 0.5 ml дестилирана вода
Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол					

Забележка: 1. Използвайте съдържанието на флаконите с разредителя за сеумните разреждания.
2. 1 IU от калибратора е еквивалентна на 1 IU от 1st IRP на човешки CEA 73/601.
1 IU от калибратора е еквивалентна на 100 ng

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

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

- Дестилирана вода
- Пипети от: 50 µl, 100 µl, 500 µl и 1000µl (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- Пипети от 5 и 10 ml за дестилирана вода
- Завихрящ смесител
- Магнитен сепаратор
- Инкубатор за 37°C
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

A. Калибратори: Реконституирайте калибраторите 0-5 с 1.0 ml дестилирана вода.
B. Контроли: Реконституирайте контролите с 0.5 ml дестилирана вода.
C. Работен измиващ разтвор: Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.
D. Разредител: Реконституирайте разредителя с количество дестилирана вода, указана на етикета на флаконите.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституция на калибраторите и контролите трябва да се приготвят равни количества и да съхраняват при температура –20°C за максимум 3 месеца.
- Реконституираният разредител на пробата е стабилен в рамките на 8 седмици при температури от 2 до 8°C.
- Пряко приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхранява при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Не използвайте проби от плазма

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки
Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 100 µl от всяко в съответните епруветки.
- Разпределете 50 µl от анти-CEA-¹²⁵I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
- Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
- Инкубирайте за 2 часа при температура 37°C.
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
- Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
- След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.

11. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

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

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

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

CEA-IRMA		cpm	В/Т (%)
Общ брой		216032	100
Калибратор	0.0 ng/ml	679	
	2.0 ng/ml	1581	0.42
	6.0 ng/ml	3621	1.36
	20.0 ng/ml	8620	3.68
	60.0 ng/ml	23790	10.70
	200.0 ng/ml	64556	29.57

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

А. Определен лимит

Дванадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0.17 ng/ml.

В. Специфичност

Измерена беше кръстосаната реактивност с антигените NCA & NCA-2 и mal-CEA & mbr-CEA, които нормално дават кръстосана реактивност. Серумните проби бяха натоварени с различни количества от NCA, NCA-2, mal-CEA или mbr-CEA както е показано на таблицата по-долу. Кръстосаната реактивност с NCA е познат феномен, който се наблюдава също и при други изследвания, свързани с CEA (виж коментарите към доклада NEQAS за CEA. Печатно разпространение 65. 1993.).

Проба	състав	Теоретична концентрация (ng/ml)	CEA-IRMA резултати (ng/ml)
C051	-	-	2.3
C052	C051 + NCA-2 (82 ng/ml)	2.3	5.7
C053	C051 + NCA-2 (163 ng/ml)	2.3	6.6
C066 C076 C068 C069	-	-	
	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L)	-	5.9
	C066 + CEA (73/603 at 100 U/L) + NCA-2 (82 ng/ml)	15.9	15.8
	C066 + NCA-2 (82 ng/ml)	15.9	18.5
C081 C082 C087 C088 C089	-	-	
	C081 + 1 µg/ml Mal CEA	3.7	6.9
	+ CEA (73/603 at 100 U/L)	-	3.7
	C087 + 8 µg/ml mbr-CEA	14	3.5
	C087 + 2 µg/ml NCA	14	14
			49.6

С. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	Отговор	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Серум	Отговор	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	12.2 ± 0.3	2.3	A	20	5.3 ± 0.4	7.4
B	20	22.8 ± 0.8	3.1	B	20	21.4 ± 1.1	5.1

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ		
Добавен CEA (ng/ml)	Възстановен CEA (ng/ml)	Възстановяване (%)
5	4.7	94.0
12.5	11.1	88.8
35	30.9	88.3
50	45.5	91.0
100	98.4	98.4

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ			
Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (ng/ml)	Измерена концентрация (ng/ml)
1	1/1	195.2	195.2
	1/2	100.1	97.6
	1/4	57.2	48.8
	1/8	30.2	24.4
	1/16	13.6	12.2
	1/32	7.0	6.1
	1/64	3.4	3.1
	1/128	2.8	1.5
2	1/1	164.8	164.8
	1/2	89.7	82.4
	1/4	52.2	41.2
	1/8	25.6	20.6
	1/16	11.0	10.3
	1/32	6.4	5.2
	1/64	3.5	2.6
	1/128	1.1	1.3

Пробите бяха разредени с разредител за проба.

Е. Закъснение между добавянето на последния калибратор и разпределението на пробата

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

Закъснение				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	7.8	8.1	8.0	8.0
S 2 (ng/ml)	27.0	26.4	26.7	25.8

Г. Ефект на кукичката

Ефект на кукичката може да бъде наблюдаван над 25000 ng/ml CEA.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (НАМА). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
- Хетерофилните антитела в човешкия серум могат да реагират с реагентните имуноглобулини, смущавайки ин витро имунотестовите.

Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофилни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела.

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

XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

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

XVI. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

% РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА СТОЙНОСТИТЕ НА СЕА					
	Стойност	0-3.0 ng/ml	3.1-5.0 ng/ml	5.1-10.0 ng/ml	> 10 ng/ml
Здрави					
Непушачи	110	96.4	2.7	0.9	0
Пушачи	64	78.1	10.9	7.8	3.1
ОБЩО	174	89.7	5.7	3.4	1.1
Незлокачествени					
Цироза	37	29.7	13.5	37.8	18.9
Болест на Крон	26	88.5	7.7	0	3.8
Злокачествени					
Колоректални	58	31.0	6.9	10.3	51.7
Млечна жлеза	50	60.0	14.0	10.0	16.0
Стомашни	61	42.6	8.2	13.1	36.1
Белодробни	50	30.0	12.0	22.0	36.0
Яйчникови	50	84.0	2.0	8.0	6.0

XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

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

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

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

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

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

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

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. BURTIN P., and GOLD P., 1978
Carcinoembryonic antigen.
Scand. J.,Immunol. 8 (suppl. 8) : 27-38
2. BOOTH S. N., JAMIESON G.C., KING J.P.G. et al., 1974
Carcinoembryonic antigen in management of colorectal carcinoma.
Br. Med. J. iv. 183-187
3. GOLD P., FREEDMAN S.G., 1965
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J. Exp. Med. 122. 467-481
4. HERLYN M., SEARS H.F., STEPLEWSKI Z. and KOPROWSKI H. 1982
Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal. gastric and pancreatic carcinoma.
J. Clin. Immunol. 2. 135-140
5. LAURENCE D.J.R., STEVENS V., BETTELHEIM R. et al. 1972
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal. mammary and bronchial carcinoma.
Br. Med. J. iii. 605-609
6. National Institute of Health Consensus Statement. 1981
Carcinoembryonic antigen ; Its role as a marker in the management of cancer.
Br. Med. J.; 282. 373-375
7. RODGERS G.T., 1976
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. Implications on its role as a tumor marker substance.
Biochem. Biophys. Acta 458. 355-373
8. STURGEON C., AL-SADIE R. and SETH J., 1993
NEQAS reporting, Comments on CEA, Distribution 65.

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (II) ml
Калибратори (0-5) Проби Трейсър	- 0.05	0.1 - 0.05	- 0.1 0.05
Инкубация	2 часа при температура 37°C		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - - - -	аспирирайте (или прелейте) 2.0 аспирирайте (или прелейте) 2.0 аспирирайте (или прелейте)	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		