



CanAg CEA EIA

Prod. No. 401-10

Gebrauchsanweisung

Immunometrischer Enzymimmunoassay-Kit

2009-11

Für 96 Tests

ZWECKBESTIMMUNG

Der "CanAg CEA EIA Kit" dient dem quantitativen Nachweis des krebsassoziierten CEA-Antigens in Serum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS

Beim carcinoembryonalen Antigen (CEA) handelt es sich um ein Glycoprotein, das zum erstenmal von Gold und Freedman (1) bei Patienten mit Dickdarmkarzinom und in Epitheltumoren endodermalen Ursprungs (Magen-Darm-Trakt) festgestellt wurde. Das CEA-Molekül ist aufgrund seines Kohlenhydratgehalts (50 bis 60 %) und je nach angewandtem Reinigungsverfahren recht heterogen. Es ist in Perchlorsäure löslich und hat eine relative Molekülmasse von ca. 175.000 bis 200.000 Dalton (2). Die immunologische und genetische Charakterisierung des CEA-Antigens hat eine Familie CEA-ähnlicher Moleküle mit gleichen antigenen Determinanten ergeben. Das relevanteste CEA-ähnliche Molekül ist das unspezifische kreuzreagierende Antigen (NCA), das sowohl von normalem als auch von pathologischem Gewebe synthetisiert wird. Das Problem kreuzreagierender CEA-ähnlicher Moleküle bei der CEA-Bestimmung kann durch Einsatz monoklonaler Antikörper überwunden werden. CanAg CEA EIA beruht auf zwei monoklonalen Maus-Antikörpern gegen die Gold-Epitope IV und V (3, 4).

CEA wird von Tumorzellen sezerniert und ist ein weithin genutzter serologischer Marker von Magen-Darm-Karzinomen, Lungen- und Brustkrebs. Bei Kolorektalkrebs hat sich der klinische Einsatz der CEA-Bestimmung zwecks Kontrolle des Ansprechens auf die Therapie und zum Nachweis einer fortschreitenden Erkrankung allgemein durchgesetzt (5, 6). CEA kann auch bei benignen entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts oder Leber-Gallen-Erkrankungen vorkommen. Diese Beobachtungen machen es erforderlich, darauf hinzuweisen, dass der CEA-Test nicht als Krebsvorsorgeuntersuchung angewandt werden sollte.

PRINZIP DES TESTS

Beim CanAg CEA EIA handelt es sich um einen nicht kompetitiven Festphasen-Immunoassay auf der Grundlage des direkten Sandwich-Verfahrens. Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben werden zusammen mit biotinyliertem monoklonalen Anti-CEA-Antikörper und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiertem monoklonalen Anti-CEA-Antikörper in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterstreifen inkubiert. Nach dem Waschen wird in jede Vertiefung gepufferte Substrat-Chromogen-Lösung (Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin) hinzugegeben und die Enzymreaktion abgewartet. Während der Enzymreaktion entwickelt sich bei Präsenz des Antigens eine Blaufärbung. Die Farbintensität ist zu der in den Proben vorhandenen CEA-Menge proportional.

Die Farbintensität wird mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm (oder wahlweise bei 405 nm nach Zugabe von Stopplösung) bestimmt. Für jeden Assay wird eine Eichkurve erstellt, indem für jeden Kalibrator der Extinktionswert gegen die Konzentration aufgetragen wird. Die CEA-Konzentrationen der Patientenproben werden dann anhand der Eichkurve abgelesen.

REAGENZIEN

- Jeder "CanAg CEA EIA-Kit" enthält Reagenzien für 96 Tests.
- Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Etikett außen auf dem Karton angegeben.
- Das Kit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Den Kit bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren.
- Die nachstehende Tabelle enthält Angaben zur Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien, sofern diese nicht verunreinigt sind, in den gut verschlossenen Originalbehältnissen aufbewahrt und vorschriftsmäßig verwendet werden. Unmittelbar nach dem Gebrauch wieder bei 2–8 °C lagern.

Komponente	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem Öffnen
MICROPLA Streptavidin-Mikroplatte	1 Platte	bis zu dem auf der Platte angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C

12 x 8 mit Streptavidin beschichtete Vertiefungen. Nach dem Öffnen nicht benötigte Streifen umgehend in die Aluminiumtüte mit Trockenmittel zurücklegen. Zum Trockenhalten wieder sorgfältig verschließen.

Komponente	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem Öffnen
------------	-------	--

CEA-Kalibratoren 6 Fläschchen bis zu dem auf den Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C

CAL	CEA	0
-----	-----	---

0 µg/l 1 x 8 ml

CAL	CEA	2
-----	-----	---

2 µg/l 1 x 0,75 ml

CAL	CEA	5
-----	-----	---

5 µg/l 1 x 0,75 ml

CAL	CEA	15
-----	-----	----

15 µg/l 1 x 0,75 ml

CAL	CEA	50
-----	-----	----

50 µg/l 1 x 0,75 ml

CAL	CEA	75
-----	-----	----

75 µg/l 1 x 0,75 ml

Humanes CEA in einer Tris-HCl-gepufferten Salzlösung mit Rinderserumalbumin, einem inerten gelben Farbstoff und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

CAL	CEA	0
-----	-----	---

sollte auch zum Verdünnen von Proben verwendet werden.

CEA-Kontrollen 2 Fläschchen bis zu dem auf den Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C

CONTROL	CEA	1
---------	-----	---

1 x 0,75 ml

CONTROL	CEA	2
---------	-----	---

1 x 0,75 ml

Humanes CEA in einer Tris-HCl-gepufferten Salzlösung mit Rinderserumalbumin und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.

BIOTIN	Anti-CEA
--------	----------

Biotin Anti-CEA 1 x 15 ml bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C

Biotinylierter monoklonaler Anti-CEA-Antikörper von Mäusen, ca. 3 µg/ml. Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH-Wert 7,2), Rinderserumalbumin, Rinderimmunglobulin, Blockierungsreagenz, Tween

20, einen inerten blauen Farbstoff und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch mit dem Tracer HRP Anti-CEA mischen.

Komponente	Menge	Lagerung und Stabilität nach dem Öffnen
CONJ Anti-CEA Tracer, HRP Anti-CEA	1 x 0,75 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Stammlösung von mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiertem monoklonalen Anti-CEA-Antikörper von Mäusen, ca. 60 µg/ml. Enthält Konservierungsmittel. Vor Gebrauch mit Biotin Anti-CEA mischen.		
SUBS TMB TMB HRP Substrate	1 x 12 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.		
STOP Stopp-Lösung	1 x 15 ml	bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Enthält 0,12 M Chlorwasserstoffsäure. Gebrauchsfertig.		
WASHBUF 25X Waschpufferkonzentrat	1 x 50 ml	bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum bei 2 bis 8 °C
Eine Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch 25fach mit Wasser verdünnen.		

Anhaltspunkte für Instabilität

Das TMB-HRP-Substrat sollte farblos oder leicht bläustichig sein. Eine Blaufärbung ist ein Anzeichen dafür, dass das Reagenz verunreinigt ist und nicht mehr verwendet werden sollte.

WARNHINWEISE UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Für In-vitro-Diagnostik.

- Nur für geschultes Fachpersonal.
- Bitte beachten Sie die Vorschriften zur Laborsicherheit in der Publikation Nr. (CDC) 88-8395 des US Department of Health and Human Services (Bethesda, MD, USA) oder andere gleichwertige regionale oder nationale Bestimmungen.
- Alle Patientenproben gelten als potenziell infektiös und sind entsprechend zu handhaben.
- Befolgen Sie die lokalen Richtlinien zur Entsorgung von anfallenden Abfallstoffen.

Achtung

Das zur Herstellung der Reagenzien aus humaner Quelle verwendete Material wurde auf HIV-1/2-Antikörper, HCV-Antikörper und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) getestet und als nicht reaktiv befunden. Da es keine Methode gibt, mit der das Vorliegen von durch Blut übertragenen Krankheiten vollkommen ausgeschlossen werden kann, sollten der Umgang mit Reagenzien aus humaner Quelle und deren Entsorgung so erfolgen, als handele es sich um potenziell infektiöses Material.

PROBENENTNAHME UND UMGANG MIT DEM MATERIAL

CanAg CEA EIA dient zur Analyse von Serumproben. Durch Venenpunktion Blut abnehmen und das Serum nach üblichen Verfahren trennen. Die Proben können zwei Tage bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Bei längeren Lagerzeiten wird eine Temperatur von –20 °C oder darunter empfohlen. Die Proben nicht wiederholt einfrieren und auftauen. Tiefgefrorene Proben möglichst bei 2 bis 8 °C langsam über Nacht auftauen lassen und dann vor der Analyse auf Raumtemperatur bringen.

VERFAHREN

Benötigtes, mit dem Kit aber nicht mitgeliefertes Material

1. Schüttler für Mikroplatten

Das Schütteln sollte mäßig bis kräftig sein. Schüttelbewegung längs: ca. 200 U/min, Schüttelfrequenz: 700-900/min.

2. Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten

Waschen der Platte wahlweise vollautomatisch durch 1 und 6 Waschzyklen, oder mit einer halbautomatischen Mikroplatten-Waschvorrichtung, die an eine Vakuumpumpe oder eine Wasserstrahl-Vakuumpumpe und ein Auffanggefäß für die abgesaugte Flüssigkeit angeschlossen ist. Wird kein automatisches Mikroplatten-Waschgerät eingesetzt, empfiehlt sich die Verwendung des manuellen Waschgerätes Nunc Immuno-8.

3. Spektrophotometer für Mikrotiterplatte

Mit einer Wellenlänge von 620 und/oder 405 nm und einem Extinktionsbereich von 0 bis 3,0.

4. Präzisionspipetten

Mit Einweg-Plastikspitzen für Mikroliter-oder Milliliter-Volumina. Eine 8-Kanal-Pipette oder Dispenserpipette mit Einweg-Plastikspitzen für 100 µl ist hilfreich, aber nicht unbedingt erforderlich.

5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Zur Herstellung der Waschlösung.

Hinweise zum Ablauf

1. Damit der ordnungsgemäße Gebrauch des "CanAg CEA EIA-Kits" sichergestellt ist, muss die Packungsbeilage genau verstanden werden. Die im Kit enthaltenen Reagenzien sind gemeinsam zu verwenden. Keine zwar identischen, aber aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern stammenden Reagenzien miteinander vermischen. Die Kit-Reagenzien nach dem außen auf dem Karton aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
2. Die Reagenzien sollten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 bis 25 °C) gebracht werden. Damit genaue Ergebnisse erzielt werden, sollte der Assay nur bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C durchgeführt werden. Gefrorene Proben sollten nur langsam auf Raumtemperatur gebracht werden und sind nach dem Auftauen leicht, aber gründlich gemischt werden.
3. Vor dem Pipettieren von Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben ist es ratsam, die Streifen zu markieren, damit die Proben während der Untersuchung und danach eindeutig zugeordnet werden können.
4. Die Notwendigkeit effizienten und gründlichen Waschens zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen und von Reagenzien aus den an der Festphase gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen ist einer der wichtigsten Schritte in einem EIA. Damit die Effizienz der Waschschrte sichergestellt ist, müssen Sie darauf achten, dass alle Kavitäten bei jedem Waschzyklus bis zum oberen Rand vollständig mit Waschlösung gefüllt werden, dass die Waschlösung angemessen schnell pipettiert wird, dass die Flüssigkeit zwischen und nach den Waschzyklen vollständig aus den Kavitäten abgesaugt wird und dass die Kavitäten leer sind. Sollten noch Flüssigkeitsreste vorhanden sein, drehen Sie die Platte um und klopfen sie vorsichtig auf saugfähigem Papier aus.
 - Automatische Teststreifen-Waschvorrichtung: Halten Sie die Anweisungen des Herstellers zur Reinigung und Instandhaltung genau ein und führen Sie vor und nach jedem Inkubationsschritt die vorgeschriebene Anzahl an Waschzyklen durch. Es wird dringend empfohlen, den Verarbeitungsmodus „Strip“ (Teststreifen) und den Waschmodus „Overflow“ (Überlauf) mit einem Pipettiervolumen von 800 µl zu verwenden. Die Aspirations-/Waschvorrichtung sollte nicht für längere Zeit mit der Waschlösung stehen gelassen werden, da die Nadeln verstopfen könnten, was dazu führt, dass zu wenig Flüssigkeit abgegeben und wieder abgesaugt wird.
5. Das TMB-HRP-Substrat ist sehr empfindlich gegenüber Kontamination. Um eine optimale Haltbarkeit des TMB-HRP-Substrats sicherzustellen, die benötigte Menge aus dem Fläschchen in ein sorgfältig gereinigtes Behältnis oder vorzugsweise in eine Einweg-Plastikschale gießen, um eine Kontamination des Reagenzes zu vermeiden. Es ist darauf zu achten, dass nur saubere Einweg-Plastikpipettenspitzen (oder Dispenser-Pipettenspitzen) verwendet werden.

6. Es ist darauf zu achten, dass beim Umgang mit Proben und Reagenzien nur saubere Einweg-Plastikpipettenspitzen verwendet werden und eine einwandfreie Pipettiertechnik angewandt wird. Verschleppung ist zu verhindern, indem die Pipettenspitze knapp über den oberen Rand der Vertiefung gehalten wird. Weder den den Plastikstreifen noch die Oberfläche der Flüssigkeit berühren. Besonders bei der Verwendung der TMB-HRP-Substrat-Lösung ist ordentliches Pipettieren unerlässlich.

Vorbereitung der Reagenzien	Stabilität der vorbereiteten Reagenzien
Waschlösung	in einem geschlossenen Behälter zwei Wochen bei 2 bis 25 °C
Die 50 ml Waschkonzentrat in einen sauberen Behälter geben und 1200 ml destilliertes oder entionisiertes Wasser zugeben, um eine 25fach verdünnte, gepufferte Waschlösung zu erhalten.	

Antikörperlösung drei Wochen bei 2 bis 8 °C

Die benötigte Menge Antikörperlösung vorbereiten, indem 50 µl Tracer, HRP Anti-CEA mit 1 ml Biotin Anti-CEA pro Streifen vermischt werden (siehe nachfolgende Tabelle und Protokoll).

Anzahl der Streifen	Tracer, HRP Anti-CEA (µl)	Biotin Anti-CEA (ml)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Zur Herstellung der Antikörperlösung eine saubere Flasche aus Kunststoff oder Glas verwenden.

Alternative: Den Inhalt des Tracers, HRP Anti-CEA in das Fläschchen mit Biotin Anti-CEA gießen und vorsichtig mischen. Es ist darauf zu achten, dass der gesamte Tracer, HRP Anti-CEA in das Fläschchen mit Biotin Anti-CEA gegossen wird.

HINWEIS: Die Antikörperlösung ist bei 2 bis 8 °C für 3 Wochen stabil. Nicht mehr Antikörperlösung vorbereiten, als innerhalb dieser Zeit verbraucht wird. Es ist darauf zu achten, dass die Lösung vorschriftsgemäß gelagert wird.

Testdurchführung

Jede Bestimmung für Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben sollte doppelt durchgeführt werden. Bei jedem Assay sollte eine Eichkurve erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben sind vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20–25 °C) zu bringen.

1. Mit der Vorbereitung der Waschlösung und der Antikörperlösung beginnen. Es ist wichtig, nur saubere Behälter zu verwenden und die Anweisungen sorgfältig zu befolgen.
2. Benötigte Anzahl Streifen der Mikroplatte in den Rahmen einsetzen. (Die nicht benötigten Streifen umgehend wieder in die Aluminiumtüte mit Trockenmittel geben und die Tüte wieder sorgfältig verschließen). Jeden Streifen einmal mit der Waschlösung waschen. Nur so viele Streifen waschen, wie innerhalb von 30 min bearbeitet werden können.
3. Nach folgendem Schema 25 µl der CEA-Kalibratoren (CAL 0, 2, 5, 15, 50, 75), Kontrollen (C1, C2) und Patientenproben (Pat.) in die Vertiefungen pipettieren:

	1	2	3	4	5	6	7 usw.
A	Cal 0	Cal 50	Pat. 1				
B	Cal 0	Cal 50	Pat. 1				
C	Cal 2	Cal 75	Pat. 2				
D	Cal 2	Cal 75	Pat. 2				
E	Cal 5	C1	usw.				
F	Cal 5	C1					
G	Cal 15	C2					
H	Cal 15	C2					

4. Mit einer 100-µl-Präzisionspipette (oder einer 100-µl-8-Kanal-Präzisionspipette) 100 µl Antikörperlösung in jede Vertiefung gegeben. Verschleppung verhindern, indem die Pipettenspitze knapp über die Vertiefungen gehalten wird. Nicht den Kunststoffstreifen oder die Oberfläche der Flüssigkeit berühren.
5. Den Rahmen mit den Mikrotiterstreifen unter konstantem Schütteln auf einem Mikroplatten-Schüttler bei Raumtemperatur (20–25 °C) über 1 Stunde (\pm 5 min) inkubieren.
6. Jeden Streifen nach dem unter Punkt 4 des Abschnitts "Hinweise zum Ablauf" beschriebenen Verfahren 6 Mal waschen.
7. Nach dem unter Punkt 4 in diesem Abschnitt beschriebenen Pipettierverfahren jeder Vertiefung 100 µl TMB-HRP-Substrat zugeben. Das TMB-HRP-Substrat sollte so schnell wie möglich in die Vertiefungen gegeben werden: die Zeit zwischen Zugabe in die erste und letzte Vertiefung sollte 5 Minuten nicht überschreiten.
8. Unter konstantem Schütteln 30 Minuten (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.

Die Extinktionswerte in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm ablesen.

Alternativopotion zu Punkt 9:

Verfügt Ihr Labor nicht über ein Mikroplatten-Spektrophotometer zum Ablesen der Extinktion bei 620 nm, können die Extinktionswerte wie folgt bestimmt werden:

Alt. 9. 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Mischen und die Extinktion innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer ablesen.

Messbereich

Mit dem "CanAg CEA EIA-Kit" können Konzentrationen zwischen 0,25 und 75 µg/l gemessen werden.

Wenn mit CEA-Konzentrationen zu rechnen sind, die oberhalb des Messbereichs liegen, wird empfohlen, die Proben vor der Analyse mit dem CEA-Kalibrator 0 zu verdünnen.

Qualitätskontrolle

Mit CEA-Kontrolle 1 und 2 können die Testserien validiert werden. Bereiche der zu erwartenden Ergebnisse sind auf den Etiketten der Fläschchen genannt. Wenn Werte außerhalb des vorgeschriebenen Bereichs erreicht werden, sollten Reagenzien und Leistung des Messgeräts komplett überprüft und die Analyse wiederholt werden. Jedes Labor kann zusätzlich eigene Serum-Pools für verschiedene Meßbereiche zusammenstellen, die dann als interne Kontrollen zur Sicherung der Präzision des Assays genutzt werden können.

Referenzmaterial

Als Referenzstandard kann die "1. International Reference Preparation IRP 73/601" genutzt werden.

Die Werte für CEA-Kalibratoren und Kontrollen wurden mit einem Set interner Referenzstandards abgeglichen, deren Werte mit einem Umrechnungsfaktor von 13,5 auf IRP 73/601 umgerechnet werden können, d. h. 1 µg/l entspricht 13,5 IU/l.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Bei Verwendung eines Mikroplatten-Spektrophotometers mit einem eingebautem Datenkalkulationsprogramm, sollte anhand der Gebrauchsanweisung des Gerätes und der auf den Etiketten jedes einzelnen CEA-Kalibrators angegebenen Konzentrationen ein entsprechendes Programm erstellt werden.

Zur automatischen Berechnung der CEA-Ergebnisse wird empfohlen, eine der nachfolgend beschriebenen Methoden anzuwenden:

- Kurvenanpassung mit kubischem Spline. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 ng/l in die Kurve aufgenommen werden.
- Kurvenanpassung mit geglättetem Spline. Kalibrator 0 sollte als Leerwert eingesetzt werden.
- Interpolation mit Punkt-zu-Punkt-Bewertung. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 ng/l in die Kurve aufgenommen werden.

- Quadratische Kurvenanpassung. Kalibrator 0 sollte mit dem Wert 0 ng/l in die Kurve aufgenommen werden.

HINWEIS: Eine 4-Parameter-Regression oder eine lineare Regression sollte nicht verwendet werden.

Zur manuellen Auswertung wird eine Eichkurve erstellt, indem die Extinktionswerte (E) für jeden CEA-Kalibrator gegen die entsprechende CEA-Konzentration (in µg/l) aufgetragen werden, siehe Abbildung weiter unten. Die unbekanntes CEA-Konzentrationen können dann unter Verwendung des Extinktionsmittelwertes jeder Patientenprobe von der Eichkurve abgelesen werden.

Wenn Proben in einer ersten Analyse CEA-Konzentrationen von mehr als 75 µg/l ergeben, sollten die Proben 1:10 und 1:100 mit CEA-Kalibrator 0 verdünnt und anschließend erneut analysiert werden, um die genaue CEA-Konzentration zu erhalten.

Verdünnung 1:10 = 50 µl Probe + 450 µl CEA 0 µg/l

Verdünnung 1:100 = 50 µl der 1:10-Verdünnung + 450 µl CEA 0 µg/l

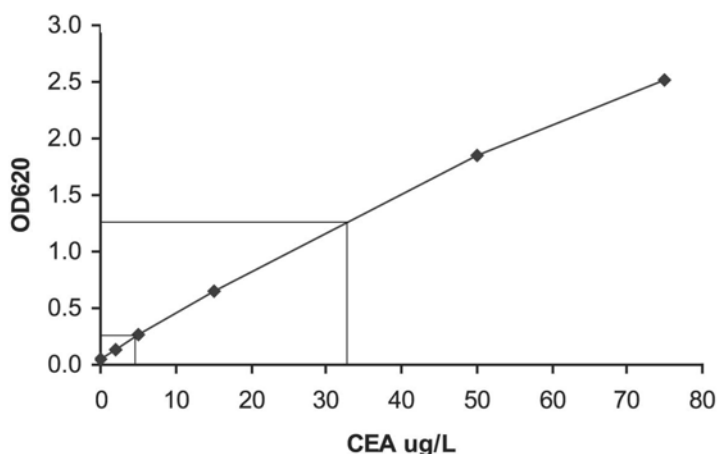
Die CEA-Konzentration der unverdünnten Proben wird dann wie folgt ermittelt:

Verdünnung 1:10: 10 x Messwert

Verdünnung 1:100: 100 x Messwert

Ergebnisbeispiele

Probe			Kalibrator- werte	Mittlerer Extinktionswert (E)	CEA µg/l
CAL	CEA	0	0 µg/l	0,050	
CAL	CEA	2	2 µg/l	0,131	
CAL	CEA	5	5 µg/l	0,259	
CAL	CEA	15	15 µg/l	0,657	
CAL	CEA	50	50 µg/l	1,857	
CAL	CEA	75	75 µg/l	2,519	
Probe A				0,220	4,1
Probe B				1,290	32,3



Beispiel (diese Kurve und die obige Tabelle dürfen nicht zur Bestimmung der tatsächlichen Assay-Ergebnisse verwendet werden!).

GRENZEN DES VERFAHRENS

Der CEA-Wert kann nicht als absoluter Nachweis für das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer malignen Krankheit genutzt werden und der CEA-Test sollte nicht in der Krebsvorsorge angewandt werden. Die Testergebnisse sollten nur in Verbindung mit anderen Untersuchungen und Verfahren zur Krankheitsdiagnose und zum Patientenmanagement interpretiert werden und der CEA-Test sollte keine der bewährten klinischen Untersuchungen ersetzen.

Gelegentlich können Anti-reagierende-Antikörper (humaner Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder heterophile Antikörper) in der Patientenprobe den Assay stören, obwohl spezifisches Blockierungsreagenz im Puffer enthalten ist.

ERWARTUNGSWERTE

CanAg CEA wurde bei 95 gesunden Blutspendern und 117 gesunden Personen zwischen 60 und 64 Jahren bestimmt. Der untere und obere Extremwert des Normal-Bereichs wurde nach der vom IFCC empfohlenen parameterfreien Statistik untersucht. Das Referenzintervall beinhaltet die zentrale 95%-Fraktion der Referenzverteilung. Das Referenzintervall umfasst 95% der um den Mittelwert herum angeordneten Werte der Referenzverteilung, entsprechend liegen die Referenzgrenzen des (unteren) 2,5%-Fraktils und des (oberen) 97,5%-Fraktils. Diese Grenzwerte schließen auf jeder Seite der Referenzverteilung 2,5% der Werte aus. Parameterfreie Schätzungen:

	Mittelwert (µg/l)	Standard- abweichung (µg/l)	Median (µg/l)	Bereich (µg/l)	Obere Referenzgrenze (Zentrale 95%- Fraktion)
Gesunde Blutspender n=95	1,3	1,0	1,0	0,5 – 9,1	3,2 µg/L
Gesunde Personen zwischen 60 und 64 Jahren, n=117	2,4	1,7	1,9	0,5 – 8,8	7,4 µg/L

96 % der gesunden Personen hatten Assaywerte unter 5 µg/l.

Jedes Labor sollte einen eigenen Normbereich bestimmen, um dem jeweiligen Umfeld wie Ernährung, Klima, Lebensbedingungen, Auswahl des Patientenkollektivs, usw. Rechnung zu tragen. Ferner sollte bedacht werden, dass die eigenen Baseline-Ergebnisse des einzelnen Patienten den wichtigsten Bezugspunkt für die Interpretation der Ergebnisse bieten. Rauchen kann den CEA-Wert bei gesunden Personen erhöhen.

LEISTUNGSMERKMALE

Präzision

Die Gesamtpräzision wurde nach der NCCLS-Richtlinie EP5-A (7) unter Verwendung von gefrorenem gepooltem humanem Serum, das zusätzlich CEA in 4 verschiedenen Konzentrationen enthielt, und zwei verschiedenen "CanAg CEA EIA"-Reagenzienkombinationen berechnet. Jede Probe wurde nach dem Zufallsprinzip pipettiert (n=2/Analyse) und zwanzig Tage lang täglich zwei Mal analysiert.

Probe	Parallelprobe	Mittelwert µg/l)	Standard- abweichung innerhalb des Laufs (µg/l)	CV innerhalb des Laufs (%)	Standard- abweichung innerhalb eines Tages (µg/l)	CV innerhalb eines Tages (%)
CEA 1	80	2,78	0,07	2,5	0,08	2,7
CEA 2	80	5,97	0,15	2,6	0,11	1,8
CEA 3	80	20,8	0,44	2,1	0,36	1,7
CEA 4	80	57,3	1,57	2,7	0,87	1,5

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg CEA EIA liegt bei $\leq 0,25 \mu\text{g/l}$ und ist definiert als die Konzentration, die dem Mittelwert der Extinktionswerte von CEA-Kalibrator 0 plus 2 Standardabweichungen laut folgender Formel entspricht:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 2} - \text{OD CAL 0}} \times 2 \mu\text{g/L}$$

Wiederfindungsrate

Markierte Serumproben wurden hergestellt, indem normalen Serumproben humanes CEA-Antigen zugegeben wurde. Die Wiederfindungsrate des zugesetzten Antigens lag zwischen 90 und 115 %.

Hook-Effekt

Beim Ablesen der Absorption bei 405 nm, also mit dem optionalen Testverfahren unter Zugabe von Stopplösung, wurde bei Proben mit bis zu 250.000 µg/L kein Hook-Effekt beobachtet. Beim Ablesen der Absorption bei 620 nm kann es bei Proben mit sehr hohen Konzentrationen zu einer Farbveränderung des Substrat von blau zu grünlich kommen. Dies kann zu einer falsch niedrigen Absorption führen, die in den Bereich der Kalibrationskurve fällt und als Hook verzeichnet wird. Derartige Hook-Effekte bei 620 nm wurden bei Proben mit Konzentrationen über 2000 µg/L verzeichnet.

Um der Aufzeichnung von fälschlicherweise niedrigen Ergebnissen aufgrund eines scheinbaren Hook-Effekts beim Ablesen der Absorption bei 620 nm entgegenzuwirken, empfiehlt sich die Anwendung des

optionalen Testverfahrens und die Absorption bei Patienten, die zum ersten Mal untersucht werden, oder bei Patienten mit erwartungsgemäß hohen CEA-Werten bei 405 nm abzulesen.

Linearität

Die Patientenproben wurden mit CEA-Kalibrator 0 seriell verdünnt und analysiert. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 90 und 120 % der Erwartungswerte.

Spezifität

Der CanAg CEA EIA basiert auf zwei monoklonalen Maus-Antikörpern, der Fänger-Antikörper MAb 12-140-10 ist gegen das Gold-Epitop IV und der Detektions-Antikörper MAb 12-140-1 ist gegen das Gold-Epitop V (4, 5) gerichtet. Bei der Ermittlung möglicher Interferenzquellen wurde die NCCLS-Richtlinie EP7-P (8) befolgt. Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden getestet und haben den Test nicht gestört.

	Konzentration ohne signifikante (± 10 %) Interferenz
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirubin, unkonjugiert	0.6 mg/ml
Hämoglobin	5 mg/ml

Methodenvergleich

Der CanAg CEA EIA wurde mit dem "Wallac Delfia CEA Kit" verglichen. Es wurden 77 humane Serumproben zwischen 0 und 790 µg/l bestimmt. Die lineare Regressionsanalyse der Ergebnisse ergab folgendes Resultat:

$$\text{CanAg CEA} = 0,90 \times \text{Delfia CEA} + 0,53 \quad r=1,00$$

GARANTIE

Die hier vorgestellten Daten wurden unter Verwendung des angegebenen Assay-Verfahrens erzielt. Jede nicht vom Hersteller Fujirebio Diagnostics empfohlene Änderung oder Modifizierung des Verfahrens kann die Richtigkeit der Ergebnisse beeinflussen. Für diese Fälle lehnt Fujirebio Diagnostics jegliche Garantie (ob ausdrückliche, stillschweigende oder gesetzliche, einschließlich der stillschweigenden Garantie der marktgängigen Qualität und Gebrauchseignung) des Produktes ab.

QUELLENVERZEICHNIS

1. Gold P. and Freedman S. O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp Med* 122: 467–481.
2. Thompson J.A. and Zimmerman W. (1988) The carcinoembryonic antigen gene family : Structure, expression and evolution. *Tumor Biol*; 9: 63–83.
3. Börner, O.P. (1992) Thesis "Immunoassays for Carcinoembryonic antigen, Specificity and Interferences", ISBN 82–7633–014–2.
4. Hammarström S. et al. (1989) Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 49: 4852–4858.
5. Tumor Marker Expert Panel, ASCO (1996) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin Oncol*; 14: 2843–2877.
6. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: 26-29.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



CanAg[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen der Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 55 Göteborg
Sweden
Phone + 46 31-85 70 30
Fax + 46 31-85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com