

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

CEA IRMA



DE38100



100 tubes



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table of Content / Inhaltsverzeichnis

1.	Verwendungszweck	3
2.	Einleitung	3
3.	Testprinzip	3
4.	Mitgelieferte Reagenzien	3
5.	Zusätzlich benötigtes Material	4
6.	Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung	4
7.	Probensammlung und -vorbereitung	4
8.	Testdurchführung	4
9.	Berechnung der Ergebnisse	5
10.	Charakterisierung des Assays	5
11.	Hinweise zur Durchführung	7
12.	Zusatzinformationen	7
13.	Warn- und Sicherheitshinweise	7
14.	Lagerung und Haltbarkeit	7
1.	Intendet use	8
2.	Introduction	8
3.	Principle of method	8
4.	Contents of the kit	8
5.	Materials, tools and equipment required	8
6.	Specimen collection and storage	9
7.	Preparation of reagents, storage	9
8.	Assay procedure	9
9.	Calculation of results	10
10.	Characterization of assay	10
11.	Procedural notes	11
12.	Limitations	11
13.	Precautions	12
14.	Storage and shelf life	12
15.	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	12

1. Verwendungszweck

Der Iod-125 CEA immunradiometrische Assay dient der direkten quantitativen *in vitro* Bestimmung des humanen karzinoembryonalen Antigens (hCEA) in humanem Serum. CEA kann in einem Bereich von 0-180 ng/ml detektiert werden. Jede Kit-Packung enthält ausreichende Reagenzien für insgesamt 100 Teströhrchen und erlaubt so die Konstruktion einer Standardkurve und die Bestimmung von 41 unbekanntem Proben in Duplikaten.

2. Einleitung

Das Karzinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Zelloberflächen Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180-200kD, welches in großen Mengen in Dickdarm-epithelzellen während der Embryonalentwicklung vorkommt. Im Dickdarmepithel von Erwachsenen sind die CEA-Level signifikant niedriger, können aber bei Auftreten von Entzündungen oder Tumoren in irgendwelchen endodermalen Geweben, wie denen des Gastrointestinaltrakts, des Respiratorischen Trakts, des Pankreas und der Brust erhöht sein. Eine Überexpression des CEA Proteins wurde in verschiedenen Adenokarzinomen beobachtet, dazu gehören Tumoren des Magens, des Pankreas, des Dünndarms, des Dickdarms, Rektaltumoren, Tumoren der Eierstöcke, der Brust, des Gebärmutterhalses und nichtkleinzellige Bronchialtumoren. CEA wird auch bei einigen nicht-malignen Krankheiten, dazu zählen Divertikulitis, Pankreatitis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Zirrhose, Hepatitis, Bronchitis, Niereninsuffizienz und bei starken Rauchern von Epithelzellen exprimiert. Daher sollte CEA nicht als spezifischer Tumormarker für das Screening der Allgemeinbevölkerung auf unentdeckten Tumoren betrachtet werden. Trotzdem liefert die Bestimmung des CEA Spiegels wichtige Informationen über eine Patientenprognose, einen möglichen Tumor Rezidiv nach chirurgischer Entfernung oder den Erfolg der Therapie.

3. Testprinzip

In diesem immunradiometrischen Assay (IRMA) werden zwei hochaffine monoklonale Antikörper verwendet. Der Iod-125 markierte Signalantikörper und der biotin-markierte Fängerantikörper sind gegen zwei verschiedene Epitope von CEA gerichtet. Die beiden Antikörper reagieren gleichzeitig mit dem vorhandenen Antigen in den Standards oder Proben, wodurch Fängerantikörper-Antigen-Signalantikörper-Komplexe, auch „sandwich“ genannt, gebildet werden. Die Immunkomplexe werden während einer zwei stündigen Inkubationszeit auf dem Schüttler an die reaktive Oberfläche der Streptavidin beschichteten Teströhrchen gebunden. Das Reaktionsgemisch wird anschließend verworfen, die Teströhrchen ausgiebig gewaschen und dann die Radioaktivität der gebundenen Immunkomplexe in einem Gamma-Counter Mesgerät gemessen. Die Antigenkonzentration ist direkt proportional zu der gemessenen Radioaktivität in den Teströhrchen. Anhand der mitgelieferten Kalibratoren und deren definierten Konzentrationen wird eine Eichkurve erstellt und aus dieser die hCEA Konzentrationen der unbekanntem Patientenproben ermittelt.

4. Mitgelieferte Reagenzien

Menge	Reagenzien	Rekonstitution
1 Flasche 21 ml 740 kBq	Anti-hCEA I-125 Tracer: ¹²⁵ Iod-markierter Anti-hCEA und Anti-hCEA Fängerantikörper in Puffer mit rotem Farbstoff und 0.1% NaN ₃	gebrauchsfertig
7 Flaschen 7 x 1.0 ml	CAL 0 – 6 Kalibratoren enthalten 0, 1.6, 3, 10, 30, 90, 180 ng/ml CEA in humanem Serum mit 0.1% NaN ₃ (WHO 1st IS 73/601 Int.Std.) (genaue Konzentrationen auf dem QC Datenblatt)	gebrauchsfertig
1 Flasche 5 ml	DIL Probenverdünner	gebrauchsfertig
2 Flaschen 2 x 1 ml	CONTROL 1 und 2 Kontrollserum (low und high) Humanserum mit 0.1 % NaN ₃ (genaue Konzentrationen auf dem QC Datenblatt)	gebrauchsfertig
2 x 50	SORB CT beschichtete Teströhrchen (12x75mm)	gebrauchsfertig
1 Flasche 20 ml	WASH SOLN 35x Waschpuffer enthält 0.2% NaN ₃	700ml destilliertes Wasser zugeben (gesamt 720ml)

5. Zusätzlich benötigtes Material

- Ständer für Teströhrchen
- Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen (50, 200 und 2000 µl)
- destilliertes Wasser
- Vortex Mixer
- Schüttler
- Plastikfolie
- Gamma-Counter

empfohlenes Material

- Multipette (z.B. Eppendorf oder ähnliche)
- Dispenser mit 1-L Reservoir (anstelle der 2-ml Pipette)

6. Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung

Lagern Sie die Reagenzien nach dem Öffnen bei 2-8°C. Bei dieser Temperatur ist jedes Reagenz bis zum angegebenen Verfallsdatum des Kits stabil. Das aktuelle Verfallsdatum ist auf der Verpackung des Kits und auf dem QC Datenblatt angegeben.

Fügen Sie dem Waschpuffer-Konzentrat (20ml) 700ml destilliertes Wasser hinzu, um eine Gesamtmenge von 720ml Waschlösung zu erhalten. Nach der Verdünnung kann die Waschlösung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum des Kits gelagert werden.

ACHTUNG!

Bringen Sie alle Reagenzien und Serumproben auf Raumtemperatur. Mixen Sie alle Reagenzien und Proben vor der Verwendung gründlich durch. Vermeiden Sie übermäßige Schaumbildung.

7. Probensammlung und -vorbereitung

Die Serumproben können nach den gängigen Verfahren die routinemäßig in klinischen Laboren verwendet werden, vorbereitet werden. Die Proben können bei 2-8 °C gelagert werden, wenn der Assay innerhalb von 24h durchgeführt wird, ansonsten sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren werden. Eingefrorene Proben sollten, bevor sie für den Test eingesetzt werden, vollständig aufgetaut und gründlich durchgemischt werden. *Proben deren hCEA Konzentration höher liegt als die des höchsten Kalibrators, sollten verdünnt und erneut gemessen werden. Es wird eine 10 fach Verdünnung empfohlen (z.B. 450 µl D + 50 µl Probe).*

8. Testdurchführung

(Kurzanleitung siehe Tabelle 1.)

1. Bringen Sie alle Reagenzien und Serumproben vor Gebrauch auf Raumtemperatur.
2. Beschriften Sie je zwei beschichtete Teströhrchen für jeden Kalibrator (0-180 ng/ml), jede Kontrolle und Probe. Zur Bestimmung der Totalaktivität beschriften Sie optional 2 normale Röhrchen.
3. Homogenisieren Sie alle Reagenzien und Proben durch behutsames Mixen und vermeiden Sie Schaumbildung.
4. Geben Sie 50 µl Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechend beschrifteten Röhrchen, ohne dabei den inneren Röhrchenboden mit der Pipettenspitze zu berühren. Benutzen Sie einen Ständer für die Röhrchen.
5. Geben Sie 200 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
6. Decken Sie alle Röhrchen mit einer Plastikfolie ab. Fixieren Sie die Halterung mit den Röhrchen sicher auf der Platte des Schüttlers. Wählen Sie eine adäquate Geschwindigkeit (min. 600 rpm) um eine gleichmäßige Durchmischung in jedem Röhrchen zu gewährleisten.
7. Inkubieren Sie die Röhrchen für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.
8. Geben Sie 2 ml der verdünnten Waschlösung in jedes Röhrchen (außer bei der Totalaktivität). Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens (außer Totalaktivität) ab oder dekantieren Sie den Überstand.
9. Wiederholen Sie Schritt 8 einmal.
10. Messen Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter für mind. 60 Sekunden aus.
11. Berechnen Sie die CEA Konzentrationen der Proben wie unter „Berechnung der Ergebnisse“ beschrieben oder benutzen Sie eine spezielle Software.

Tabelle 1: Kurzanleitung, Pipettierschema (alle Volumina in µl)

Röhrchen	Total	Kalibrator	Kontrolle	Proben
Kalibrator		50		
Kontrolle			50	
Proben				50
Tracer	200	200	200	200
1 Stunde schütteln bei Raumtemperatur				
Waschlösung		2000	2000	2000
Überstand absaugen oder dekantieren				
Waschlösung		2000	2000	2000
Überstand absaugen oder dekantieren				
Messen der Radioaktivität (60 Sek/Röhrchen)				
Berechnen der Konzentrationen				

9. Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung wird hier unter Verwendung repräsentativer Daten erklärt. Ihre ermittelten Testdaten sollten denen in Tabelle 2 dargestellten ähneln.

Berechnen Sie den Mittelwert aus den „counts per minute“ (CPM) für jeden Doppelansatz. Berechnen Sie mit Hilfe der folgenden Formel, den normalisierten Bindungsprozentsatz für jeden Kalibrator beziehungsweise jede Probe und Kontrolle:

$$B/T(\%) = \frac{S_{1-6} / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Zeichnen Sie eine Standardkurve, indem Sie den B/T (%) für jeden Kalibrator gegen die dazugehörige CEA Konzentration auf semi-logarithmischen Millimeterpapier eintragen. Berechnen Sie die CEA Konzentration für jede unbekannte Probe durch Interpolation aus der Standardkurve. Werte außerhalb des Bereichs der Standardkurve werden nicht extrapoliert.

Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

Tabelle 2: Typische Testwerte

Tubes	hCEA ng/ml	Count cpm	Mean cpm	B/T%
T		307879 310574	309211	
S0	0	81 88	85	0.027
S1	1.6	1900 1898	1899	0.59
S2	3	3461 3387	3424	1.08
S3	10	10679 10443	10712	3.44
S4	30	33306 33520	33413	10.78
S5	90	87390 89529	88460	28.58
S6	180	143200 143211	143205	46.28

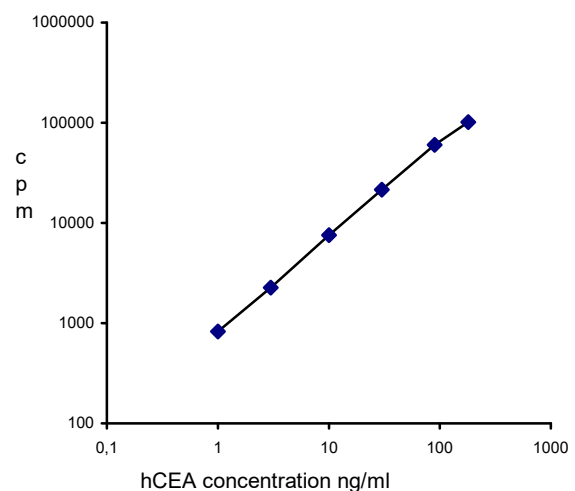


Abb. 1: typische Standardkurve
(nicht zur Berechnung der Proben verwenden)

10. Charakterisierung des Assays

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität gegen NCA in normalen physiologischen Mengen gemessen

Sensitivität

Die analytische Sensitivität wird definiert als die niedrigste Konzentration (Nachweisgrenze) ermittelt aus der 2-fachen Standardabweichung vom Null-Standard. Die analytische Sensitivität wurde durch 15-fache Wiederholung der Messung des Null-Kalibrators ermittelt und beträgt bei Verwendung von frisch markierten I-125 Tracern 0.01 ng/ml und 0.05 ng/ml bei der Verwendung von 4 Wochen alten I-125 Tracern.

Die funktionale Sensitivität wird durch die Messung von hCEA Konzentrationen, die signifikant unterschiedlich zum Null-Kalibrator sind, ermittelt und definiert als Interassay Präzisionsprofil (22% CV). Die funktionale Sensitivität beträgt < 0.4 ng/ml.

Basierend auf 120 Bestimmungen mit 60 Blank- und 60 Low-Level-Proben und mit 95%iger Wahrscheinlichkeit sind die Messgrenzen:

Limit of Blank (LoB): 0.035 ng/mL

Limit of Detection (LoD): 0.09 ng/mL

Präzision

Um die intra-Assay Präzision zu ermitteln, wurden Tests mit 5 Kontroll-Poolproben in 10 Wiederholungen durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind nachfolgend aufgeführt:

Probe	Anzahl an Wiederholungen	Mittelwert ng/ml	SD ng/ml	CV %
1	10	3.12	0.12	4.0
2	10	5.01	0.05	3.1
3	10	34.16	0.41	1.2
4	10	52.20	1.36	2.6
5	10	80.06	1.12	1.4

Reproduzierbarkeit

Um die inter-Assay Präzision zu ermitteln, wurden 5 Kontroll-Poolproben in Duplikaten in 15 unabhängigen Assays von drei verschiedenen Anwendern und mit verschiedenen Kit-Chargen gemessen. Die erhaltenen Werte sind nachfolgend aufgeführt:

Probe	Anzahl an Wiederholungen	Mittelwert ng/ml	SD ng/ml	CV %
1	15	0.40	0.04	9.52
2	15	3.01	0.18	6.00
3	15	11.13	0.59	5.29
4	15	22.30	0.97	4.37
5	15	47.66	1.89	3.98

Verdünnungstest (Linearität)

Unterschiedliche humane Serumproben wurden mit dem Probenverdünner des Kits verdünnt. Die so verdünnten Proben wurden nach Herstellerangaben mit dem Kit gemessen. Die ermittelten Ergebnisse ergaben einen Bereich von 97.6-108%.

Wiederfindungstest

Als Wiederfindung bezeichnet man die erwartete messbare Konzentrationserhöhung einer Serumprobe nach Zugabe von definierten hCEA Mengen in Prozent („spiking“). Die durchschnittliche Wiederfindung in 5 Serumpoolproben gespickt mit 3 verschiedenen hCEA Konzentrationen betrug: $99.4 \pm 5.2\%$, in einem Bereich von 90% bis 108%.

Erwartete Werte

Bei 95% der untersuchten, gesunden Personen liegen die CEA Konzentrationen normalerweise bei <3.0 ng/ml. Bei Rauchern liegen die normalen CEA Konzentrationen gewöhnlich bei <5.0 ng/ml.

Es wird darauf hingewiesen, dass jedes Labor eigene Referenzbereiche für sein eigenes Patientenkollektiv ermitteln sollte. Die Ergebnisse dieses Tests sollten immer im Zusammenhang mit anderen entsprechenden klinischen Informationen gesehen werden. Keiner der *in vitro* Diagnostik Kits kann alleine als Mittel zum Nachweis für irgendwelche Störungen oder Krankheiten herangezogen werden.

Hook Effekt

Es gibt keinen hochdosierten Hook-Effekt bis zu 15000 ng/mL.

11. Hinweise zur Durchführung

- 1) **Fehlerquelle!** Die reaktiven Teströhrchen sind in Plastikschanteln verpackt und nicht extra beschriftet. Achten Sie darauf, diese nicht mit normalen Teströhrchen zu vermischen.
- 2) **Fehlerquelle!** Um eine effiziente Durchmischung der Proben zu gewährleisten, sollten die Röhrchen sehr fest in der Röhrchen Halterung stecken. Verwenden Sie keine Ständer mit offenen Löchern. Ein ungleichmäßiges oder inkomplettes Schütteln kann zu mangelhaften Testergebnissen führen.

12. Zusatzinformationen

- Die im Kit enthaltenen Reagenzien sind für die Messung der hCEA Level im Serum und Plasma optimiert.
- Vermeiden Sie das Einfrieren und Auftauen der Reagenzien und Proben.
- Hämolytische und lipämische Proben können zu falschen Werten führen und sollten nicht verwendet werden.
- Es sollten keine Komponenten verschiedener Lots oder von unterschiedlichen Herstellern gemischt oder vertauscht werden.
- Dieses Kit sollte nur in der *in vitro* Diagnostik Anwendung finden.

13. Warn- und Sicherheitshinweise

Radioaktivität

Dieses Produkt enthält radioaktives Material. Es liegt in der Verantwortung des Nutzers die lokalen Bestimmungen oder gesetzliche Vorschriften die das Umgehen mit radioaktivem Material betreffen einzuhalten.

Potenziell infektiöses Material

Die in diesem Kit verwendeten humanen Blutprodukte stammen von gesunden Spendern. Sie wurden individuell mit anerkannten Methoden (EIA, Enzym Immunassay) negativ auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Humane Immunodeficiency Virus Antikörper (Anti-HIV-1/2), Hepatitis C (anti-HCV), Treponema und Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg) getestet. Beim Umgang mit humanen Proben die in diagnostischen Kits getestet werden, sollte immer große Sorgfalt walten gelassen werden. Auch wenn eine Person negativ getestet wurde, kann keine Methode komplette Sicherheit gewähren, dass keine infektiösen Erreger vorhanden sind. Daher sollten humane Blutproben grundsätzlich wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Alle tierischen Produkte und Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Dennoch sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Die Rinderbestandteile stammen aus Ländern, in denen keine bovine spongiforme Enzephalopathie gemeldet wurde. Dennoch sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Chemische Gefährdung

Die Komponenten enthalten Natrium Azid als antimikrobielles Mittel. Bei der Entsorgung des Abfalls sollte mit ausreichend Wasser nachgespült werden, um die Anhäufung von explosivem metallischem Azid in Kupfer- und Bleirohren zu vermeiden. Die Gesamtmenge von Azid in jedem Paket beträgt 74 mg.

14. Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie dieses Produkt bei 2-8°C.
Haltbarkeit: 60 Tage ab Verfügbarkeit.

1. Intended use

The ^{125}I -hCEA IRMA system provides a direct *in vitro* quantitative determination of human carcinoembryonic antigen (hCEA) in human serum in the range of 0-180 ng/mL. Each kit contains materials sufficient for 100 assay tubes permitting the construction of one standard curve and the assay of 41 unknowns in duplicate.

2. Introduction

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a cell-surface glycoprotein with a molecular weight of 180-200kD, that occurs in high levels in colon epithelial cells during embryonic development. Levels of CEA are significantly lower in colon tissue of adults, but can become elevated when inflammation or tumours arise in any endodermal tissue, including in the gastrointestinal tract, respiratory tract, pancreas and breast.

An overexpression of CEA protein has been detected in a variety of adenocarcinomas, including gastric, pancreatic, small intestine, colon, rectal, ovarian, breast, cervical and non-small-cell lung cancers. CEA is also expressed by epithelial cells in several non-malignant disorders, including diverticulitis, pancreatitis, inflammatory bowel disease, cirrhosis, hepatitis, bronchitis and renal failure and also in heavy smokers.

Therefore CEA should not be regarded as a tumour-specific marker for the screening of general population for undetected cancers. However, the determination of CEA levels provides important information about patient prognosis, recurrence of tumours after surgical removal and effectiveness of therapy.

3. Principle of method

The technology uses two high affinity monoclonal antibodies in an immunoradiometric assay (IRMA) system.

The ^{125}I labelled signal-antibody binds to an epitope of the CEA molecule spatially different from that recognised by the biotin-capture-antibody. The two antibodies react simultaneously with the antigen present in standards or samples, which leads to the formation of a **capture antibody - antigen - signal antibody** complex, also referred to as a "sandwich".

During a 1-hour incubation period with shaking the immuno-complex is immobilized to the reactive surface of streptavidin coated test tubes. Reaction mixture is then discarded, test tubes are washed exhaustively, and the radioactivity is measured in a gamma counter.

The concentration of antigen is directly proportional to the radioactivity measured in test tubes. By constructing a calibration curve plotting binding values against a series of calibrators containing known amount of hCEA, the unknown concentration of hCEA in patient samples can be determined.

4. Contents of the kit

1. **Anti-hCEA I-125** 1 bottle of TRACER (21 mL), ready to use, containing about 740 kBq ^{125}I -anti-hCEA and capture anti-hCEA in buffer with red dye 0.1 % NaN_3 .

2. **CAL 0 - 7** 7 vials of STANDARDS (7 x 1mL), ready to use, containing appr. 0, 1.6*, 3, 10, 30, 90, 180 ng/mL hCEA (WHO 1st IS 73/601 Int.Std.) in human serum with 0.1% NaN_3 .

(*for exact concentrations see on the QC datasheet)

3. **CONTROL 1 and 2** 2 vials of CONTROL SERA (2 x 1 mL), low (CI) and high (CII). Human sera with 0.1% NaN_3 . Ready to use. The concentrations of the control sera are specified in the quality certificate enclosed.

4. **DIL** 1 vial of SAMPLE DILUENT (5 mL), ready to use. Prepared in equine serum.

5. **SORB CT** 2 boxes of COATED TUBES, ready to use. 2x50 reactive test tubes, 12x75 mm, packed in plastic boxes.

6. **WASH SOLN 35x** 1 bottle of WASH BUFFER CONCENTRATE (20 mL), containing 0.2% NaN_3 . See *Preparation of reagents*.
Quality certificate, Pack leaflet

5. Materials, tools and equipment required

Test tube rack, precision pipettes with disposable tips (50, 200 and 2000 μL), distilled water, vortex mixer, shaker, plastic foil, adsorbent tissue, gamma counter.

Recommended tools and equipment

Repeating pipettes (e.g. Eppendorf or else), dispenser with 1-L reservoir (instead of the 2-mL pipette).

6. Specimen collection and storage

Serum samples can be prepared according to common procedures used routinely in clinical laboratory practice. Samples can be stored at 2-8 °C if the assay is carried out within 24 hours, otherwise aliquots should be prepared and stored deep frozen (-20°C). Frozen samples should be thawed and thoroughly mixed before assaying. Hemolyzed and lipemic specimens may give false values and should be avoided.

Samples with a CEA concentration higher than 180 ng/mL should be diluted with the Diluent (D) and re-assayed. Recommended dilution: 10-fold (450 µL D + 50 µL sample).

7. Preparation of reagents, storage

Store the reagents between 2-8°C after opening. At this temperature each reagent is stable until the expiration date of the kit. The actual expiration date is given on the package label and in the quality certificate.

Add the wash buffer concentrate (20 mL) to 700 mL distilled water to obtain 720 mL wash solution. Upon dilution store at 2-8°C until the expiration date of the kit.

CAUTION!

Equilibrate all reagents and serum samples to room temperature. Mix all reagents and samples thoroughly before use. Avoid excessive foaming.

8. Assay procedure

(For a quick guide , refer to Table 1.)

1. Equilibrate reagents and samples to room temperature before use.
2. Label coated tubes in duplicate for each standard, control sera and samples. Optionally, label two test tubes for total count (T).
3. Homogenize all reagents and samples by gentle mixing to avoid foaming.
4. Pipette 50 µl of standards, controls and samples into the properly labelled tubes. Use rack to hold the tubes. Do not touch or scratch the inner bottom of the tubes with pipette tip.
5. Pipette 200 µl of tracer into each tube.
6. Seal all tubes with a plastic foil. Fix the test tube rack firmly onto the shaker plate. Turn on the shaker and adjust an adequate speed such that liquid is constantly rotating or shaking in each tube (min. 600 rpm).
7. Incubate tubes for 1 hour, shaking at room temperature.
8. Add 2.0 mL of diluted wash buffer to each tube. Decant the supernatant from all tubes by the inversion of the rack. In the upside down position place the rack on an absorbent paper for 2 minutes.
9. Return the tube-rack to an upright position and repeat step-8 one more time.
10. Count each tube for at least 60 seconds in a gamma counter.
11. Calculate the CEA concentrations of the samples as described in calculation of results or use special software.

Table 1. Assay Protocol, Pipetting Guide (all volumes in microlitres)

Tubes	Total	Standard	Control	Sample
Standard		50		
Control			50	
Sample				50
Tracer	200	200	200	200
Shake for 1 hour at room temperature				
Wash buffer		2000	2000	2000
Decant the fluid and blot on filter paper				
Wash buffer		2000	2000	2000
Decant the fluid and blot on filter paper				
Count radioactivity (60 sec/tube)				
Calculate the results				

9. Calculation of results

The calculation is illustrated using representative data. The assay data collected should be similar to those shown in Table 2.

Calculate the average count per minute (CPM) for each pair of assay tubes.

Calculate the normalized percent binding for each standard, control and sample respectively by using the following equation:

$$B/T(\%) = \frac{S_{1-6} / C_{I-II} / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Using semi-logarithmic graph paper plot B/T (%) for each standard versus the corresponding concentration of CEA.

Determine the CEA concentration of the unknown samples by interpolation from the standard curve. Do not extrapolate values beyond the standard curve range.

Out of fitting programs applied for computerized data processing logit-log, or spline fittings can be used.

Automated data processing systems are also available.

Table 2. Typical assay data

Tubes	hCEA ng/mL	Count cpm	Mean cpm	B/T%
T		307879 310574	309211	
S0	0	81 88	85	0.027
S1	1.6	1900 1898	1899	0.59
S2	3	3461 3387	3424	1.08
S3	10	10679 10443	10712	3.44
S4	30	33306 33520	33413	10.78
S5	90	87390 89529	88460	28.58
S6	180	143200 143211	143205	46.28

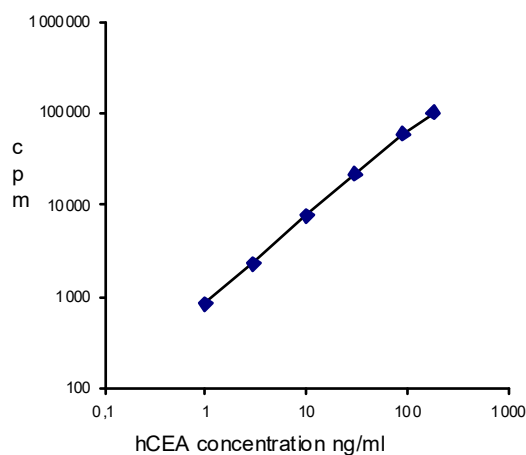


Figure 1: A typical standard curve (Do not use to calculate unknown samples)

10. Characterization of assay

Specificity

No cross reactivity with NCA can be detected in normal physiological levels.

Sensitivity

The analytical sensitivity or minimum detectable limit is calculated by the interpolation of the mean counts of zero standard plus 2 standard deviation from the standard curve. Determination was carried out using 15 replicates of zero standard response.

The value of analytical sensitivity is 0.01 ng/mL measured using new tracer and 0.05 ng/mL measured using 4-week old tracer.

The functional sensitivity is a measure of the hCEA concentration that is significantly different from zero as determined by the inter-assay precision profile (22 % CV).

The value of functional sensitivity is: < 0.4 ng/mL.

Based on 120 determinations, with 60 blank and 60 low-level samples and with 95% probability, measurement limits are:

Limit of Blank (LoB): 0.035 ng/mL

Limit of Detection (LoD): 0.09 ng/mL

Precision

5 control pool samples were assayed in 10 replicates to determine intra-assay precision. Values obtained are shown below:

Sample	Replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	3.12	0.12	4.0
2	10	5.01	0.05	3.1
3	10	34.16	0.41	1.2
4	10	52.20	1.36	2.6
5	10	80.06	1.12	1.4

Reproducibility

To determine inter-assay precision 5 control sample pools were measured in duplicates in 15 independent assays by 3 operators using different kit batches. Values obtained are shown below:

Sample	Replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	15	0.40	0.04	9.52
2	15	3.01	0.18	6.00
3	15	11.13	0.59	5.29
4	15	22.30	0.97	4.37
5	15	47.66	1.89	3.98

Linearity – dilution test

Individual human serum samples were diluted with the sample diluent of the KIT. The diluted samples were measured according to KIT protocol.

The recovery results were in the 97.6 – 108% range.

Recovery

Recovery was defined as the measured increase expressed as per cent of expected increase upon spiking serum samples with known amount of hCEA. The average per cent recover for 5 serum pools spiked with hCEA at 3 levels was: $99.4 \pm 5.2\%$, with a range of 90% to 108%.

Expected Values

In 95% of healthy subjects, CEA levels are usually < 3.0 ng/mL.

For individuals who smoke normal CEA levels are usually < 5.0 ng/mL.

It is recommended that each laboratory determine a reference range for its own patient population.

The results obtained should only be interpreted in the context of the overall clinical picture. None of the in vitro diagnostic kits can be used as the one and only proof of any disease or disorder.

Hook effect

There is no high dose hook effect up to 15000 ng/mL.

11. Procedural notes

1) **Source of error!** Reactive test tubes packed in plastic boxes are not marked individually. Care should be taken of not mixing them with common test tubes. To minimize this risk, never take more tubes than needed out of plastic box, and put those left after work back to the box. It is recommended to label assay tubes by a marker pen.

2) **Source of error!** To ensure the efficient rotation, tubes should be firmed tightly inside the test tube rack. Never use a rack type with open hole. An uneven or incomplete shaking may result in a poor assay performance.

12. Limitations

The reagents supplied in this kit are optimized to measure hCEA levels in serum.

Avoid freezing and thawing of reagents and specimens.

Components from various lots or from kits of different manufacturers should not be mixed or interchanged.

13. Precautions

Radioactivity

This product contains radioactive material. It is the responsibility of the user to ensure that local regulations or code of practice related to the handling of radioactive materials are satisfied.

Biohazard

Human blood products used in the kit have been obtained from healthy human donors. They were tested individually by using approved methods (EIA, enzyme immunoassay), and were found to be negative for the presence of antibodies to Human Immunodeficiency Virus (Anti-HIV-1/2), Hepatitis- C antibody (anti-HCV), Treponema antibody and Hepatitis-B surface Antigen (HBsAg). Care should always be taken when handling human specimens to be tested with diagnostic kits. Even if the subject has been tested, no method can offer complete assurance that infectious agents are absent. Human blood samples should therefore be handled as potentially infectious materials.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious materials.

Bovine components originate from countries where bovine spongiform encephalopathy has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious materials.

Chemical hazard









Components contain sodium azide as an antimicrobial agent. Dispose of waste by flushing with copious amount of water to avoid build-up of explosive metallic azides in copper and lead plumbing. The total azide present in each pack is 74 mg.

14. Storage and shelf life

Store this product at a temperature of 2-8°C

Shelf-life: 60 days from availability

15. SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore