

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОЕМБРІОНАЛЬНОГО АНТИГЕНУ (СЕА)

1825-300, Carcinoembryonic Antigen (CEA) Test System

Каталог. №: **1825-300**

Методика від **16-07-2019**

Кількість : **96**

Версія **4**

Виробник : **Monobind Inc., (США)**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

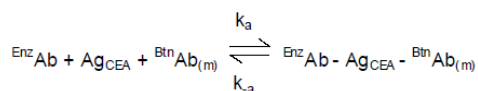
Призначення: Кількісне визначення концентрації карциноембріонального антигена (СЕА) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 РЕЗЮМЕ І ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до СЕА. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген СЕА, між СЕА антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{CEA} = Нативний антиген (змінна кількість)

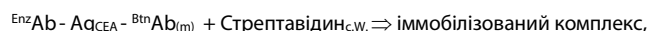
EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{CEA}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{с.в.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори СЕА – 1 мл/флакон

6 флаконів референсної сироватки з концентраціями СЕА 0(A), 5(B), 10(C), 25(D), 50(E) і 250(F) нг/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консерванти.

Зауваження: Стандарти на основі людської сироватки калібровані по референс-препарату, дослідженому по 1-му міжнародному референс-препарату (IRP № 73/601).

B. Ферментний реагент СЕА – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить фермент-мічені антитіла, біотинильовані моноклональні мишачі IgG, специфічні до СЕА, в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Планшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-30 °С.

E. Субстрат А – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або дозаторна пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитися відповідно до місцевих нормативно-законодавчих вимог.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні низького, нормального та підвищеного діапазону для контролю ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин - Стабільний протягом одного року

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту СЕА у кожен лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунок.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується дозуюча пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводиться при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації СЕА в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації СЕА в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації СЕА в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.391 перетинає стандартну криву при 22.5 нг/мл (див. мал.1)

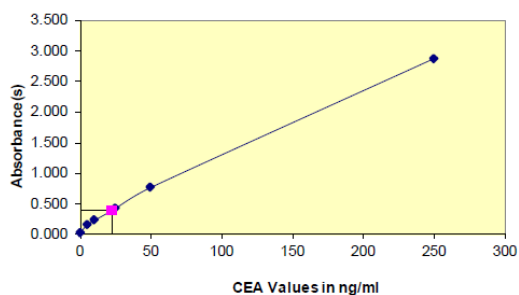
Примітка: Програмне забезпечення комп'ютера для обчислення даних, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація
Калібратор А	A1	0.017	0.018	0
	B1	0.019		
Калібратор В	C1	0.160	0.159	5
	D1	0.159		
Калібратор С	E1	0.231	0.227	10
	F1	0.224		
Калібратор D	G1	0.431	0.424	25
	H1	0.418		
Калібратор E	A2	0.776	0.770	50
	B2	0.763		
Калібратор F	C2	2.851	2.866	250
	D2	2.880		
Зразок	E2	0.398	0.391	22.5
	F2	0.384		

*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність Калібратора «F» повинна бути ≥ 1.8 .
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і

- стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
 - Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
 - Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
 - Зразки з концентраціями СЕА понад 250 нг/мл необхідно розвести (наприклад, 1:10 або вище) нормальною чоловічою сироваткою (СЕА < 5 нг/мл) і проаналізувати повторно. Результат помножити на фактор розведення (10).
 - Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
 - Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
 - Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
 - Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинна проводитися кваліфікованою особою або навченим фахівцем.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів» Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- СЕА має низьку клінічну чутливість і специфічність як раковий маркер. **Клінічно підвищене значення СЕА не має діагностичної цінності як тест на рак, і його слід застосовувати лише у поєднанні з іншими клінічними проявами (спостереженнями) та діагностичними параметрами.** Є пацієнти з колоректальним раком, які не мають підвищених значень СЕА, а підвищені значення СЕА не завжди змінюються з прогресуванням або регресом захворювання. Курці демонструють більш високий діапазон базових значень, ніж некурці.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Близько 99% не курящих мають концентрації СЕА нижчі 5 нг/мл. Так само 99% курящих мають концентрації нижчі 10 нг/мл.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тесту СЕА

Не курячі	< 5 нг/мл	Курячі	< 10 нг/мл
-----------	-----------	--------	------------

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору СЕА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	4.8	0.35	7.3
Рівень 2	20	21.7	1.35	6.2
Рівень 3	20	60.5	3.58	5.9

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (нг/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	5.0	0.41	8.2
Рівень 2	10	21.2	1.25	5.9
Рівень 3	10	59.5	3.15	5.3

*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 0.025 нг. Це еквівалентно зразку з концентрацією 1 нг/мл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/мл) плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним імуноферментним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з низькими, нормальними і високими показниками. Загальне число зразків було 202. Було виведено рівняння регресії за методом найменших квадратів і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	5,67	Y=-0.1164 + 1,0324 (x)	0.935
Метод порівняння	5,75		

14.4 Специфічність

Для оцінки специфічності антитіл використовувалися масивні концентрації можливих перехресно-реагуючих речовин при додаванні до відомих сироватковим пулам і досліджені паралельно з базовою сироваткою. Не знайдено перехресної реактивності. Дані наведені в таблиці нижче.

ТАБЛИЦЯ 5

Субстрат	Концентрація
Ацетилсаліцилова кислота	100 мкг/мл
Аскорбінова кислота	100 мкг/мл
Кофеїн	100 мкг/мл
AFP	10 мкг/мл
PSA	1.0 мкг/мл
CA-125	10,000 Од/мл
hCG	1000 МОд/мл
hLH	10 МОд/мл
hTSH	100 мМОд/мл
Пролактин	100 мкг/мл

14.5 Лінійність і Хук-ефект

Для дослідження лінійності і Хук-ефекту використовували 3 різних лота набору. Масивні концентрації СЕА (більше 60,000 нг/мл) використовувалися для лінійних розведень в пулованій людській сироватці пацієнтів. Тестування показало відсутність Хук-ефекту аж до концентрації 60,000 нг/мл і відновлення від 92.0% до 111.4%.



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

