

**НАБІР ІФА**  
**ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ**  
**РАКОВО-ЕМБРІОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА**  
**(CEA)**

**401-10, CanAg CEA EIA**

Каталог. №: 401-10

Методика від 10-2014

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics, Inc.,  
(Швеція)



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

**ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ**

Набір CanAg CEA EIA призначений для кількісного визначення Раково-ембріонального антигену (CEA) в сироватці крові людини.

**ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ** (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

**ПРИНЦИП МЕТОДУ**

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій техніці "сендвіч". Калібратори, контролю та сироватки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-CEA моноклональними антитілами і моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (HRP) в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. Після промивання в кожну лунку додається буферний реагент субстрат/хромоген (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції в присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену CEA, присутньому у зразку. Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що необов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація CEA в зразках пацієнта розраховується з калібрувальної кривої.

**РЕАГЕНТИ**

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °С. Не заморозуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. Негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °С) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °С до закінчення терміну придатності
12x8 мікролунок, покритих стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатайте пакет, зберігайте сухим.		

Калібратори CEA	1 флакон х 8 мл, 5 флаконів х 0.75 мл, 0-2-5-15-50-75 мкг/л	2-8 °С до закінчення терміну придатності
-----------------	---	--

Людський CEA в трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, інертний жовтий барвник і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання. Калібратор 0 також використовується для розведення зразків.

Контролі CEA	2 флакона х	2-8 °С до закінчення терміну
--------------	-------------	------------------------------

0.75 мл придатності

Людський CEA в трис-НСІ буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання.

Біотин Анти-CEA	1 флакон х 15 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-----------------	------------------	--

Біотин Анти-CEA моноклональне мишаче антитіло, ~ 3 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (рН 7.2), бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, Tween 20, інертний синій барвник і 0.01% метил-ізоціазолін (MIT) в якості консерванту. Змішати з Трейсером, HRP Анти-CEA перед використанням.

Трейсер, HRP Анти-CEA	1 флакон х 0.75 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-----------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-CEA моноклональними мишачими антитілами, ~ 60 мкг/мл. Повинен бути перед використанням змішаний з Біотином анти-CEA перед використанням. Містить консерванти.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон х 12 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Сток-розчин	1 флакон х 15 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	------------------	--

Містить 0.12 М соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивального буфера	1 флакон х 50 мл	2-8 °С до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить ТРИС-НСІ сольовий розчин з ТВН 20 і Germall II як коСЕАрвант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

**Ознаки нестабільності**

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

**ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

**Для використання в in-Vitro діагностиці**

- Тільки для професійного використання
- Будь ласка, зверніться до публікації Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США (Bethesda, штат Меріленд, США) публікація № (CDC) 88-8395 щодо лабораторної безпеки або будь-якого іншого місцевого або національного регулювання.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Дотримуйтеся місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

**Увага**

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

**ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ**

CanAg CEA EIA призначений для використання з сироваткою. Проведіть збір крові з вени і відокремте сироватку відповідно до звичайних процедур. Зразки можуть зберігатися при температурі 2-8 °С протягом 2 днів. Для більш довгих періодів зберігати при -20 °С або нижче. Уникати повторних циклів заморозки-відтавання. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі 2-8 °С протягом ночі, а потім привести зразки до кімнатної температури перед аналізом.

**ПРОЦЕДУРА**

**Необхідні матеріали, що не поставляються з набором**

1. **Мікропланшетний шейкер**  
Струшування має бути середнім або енергійним, приблизно 700-1100 коливань/хвилину.
2. **Пристрій для промивання мікропланшета**  
Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати 8-канальну піпетку зі змінними наконечниками об'ємом 350 мкл.

### 3. Мікропланшетний Рідер

З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.

### 4. Точні піпетки

З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мікролітах та мілілітрах.

### 5. Дистильована або деіонізована вода

Для приготування Промивного Розчину.

### Примітки до методики

- Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору СЕА ЕІА. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.
- Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °С) перед використанням. Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-28 °С для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'яко, але ретельно перемішані обережним перевертанням флаконів після відтавання.
- Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.
- Вимога ефективною і ретельною промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукати нею по фільтрувальному паперу.
  - Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо належного очищення та обслуговування і проводьте необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Рекомендується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переповнення* з об'ємом заповнення 800 мкл. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.
- Субстрат ТМВ-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності ТМВ HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).
- Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином ТМВ-субстрату HRP.

5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Розчину Антитіл.

**Альтернатива:** Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-CEA у флакон з Біотином Анти-CEA і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трейсер, HRP Анти-CEA повністю перелитий у флакон з Біотином Анти-CEA.

**ПРИМІТКА:** Розчин Антитіл стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °С. Не готуйте більше Розчину Антитіл, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролю і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °С).

- Приготуйте Промивний Розчин і Розчин Антитіл. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
- Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збирається використовувати протягом 30 хвилин.
- Внесіть 25 мкл СЕА Калібраторів (CAL 0, 2, 5, 15, 50, 75), контролей (С) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. 0	Кал. 50	Невід. 1		
B	Кал. 0	Кал. 50	Невід. 1		
C	Кал. 2	Кал. 75	Невід. 2		
D	Кал. 2	Кал. 75	І т.д.		
E	Кал. 5	C1			
F	Кал. 5	C1			
G	Кал. 15	C2			
H	Кал. 15	C2			

- Додайте 100 мкл Розчину Антитіл в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
- Інкубуйте пластину протягом 1 години (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °С) з постійним потрушуванням.
- Після інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів.
- Додайте 100 мкл субстрату ТМБ в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунку не перевищував 5 хвилин.
- Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
- Негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

### Варіант

Якщо в лабораторії немає рідера з фільтром на 620 нм, оптична щільність може бути визначена як описано нижче:

Алт. 9. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

### Діапазон вимірювання

СЕА ЕІА вимірює концентрації між 0.25 і 75 мкг/л. Якщо концентрація СЕА вище діапазону вимірювання, як очікується, рекомендується розбавляти зразки з Калібратором 0 перед аналізом.

### Контроль якості

Контролі СЕА 1 і 2 можуть бути використані для перевірки серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо значення виходять за межі зазначених діапазонів, необхідно провести повну перевірку реагентів і продуктивності зчитувача і повторити аналіз. Кожна лабораторія може додатково підготувати свої власні пули сироватки на різних рівнях, які можна використати в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °С в герметичному контейнері
Розчин Антитіл	3 тижні при 2-8 °С в герметичному контейнері

Налийте 50 мл промивного концентрату в чисту посудину і розбавте в 25 разів додаванням 1200 мл дистильованої або деіонізованої води для отримання буферного розчину для промивання.

Приготуйте потрібний об'єм Розчину Антитіл змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP Анти-CEA з 1 мл Біотину Анти-CEA на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трейсер, HRP Anti-CEA (мкл)	Біотин Анти-CEA (мл)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4

## Референсний матеріал

1-й Міжнародний стандарт 73/601 може бути використаний як еталонний стандарт. Значення для СЕА Калібраторів і Контролей були призначені з набором внутрішніх еталонів, значення яких визначались відповідно до IRP 73/601 з використанням коефіцієнта перетворення 13.5, наприклад, 1 мкг/л відповідає 13.5 МОд/л.

## РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з СЕА калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів СЕА рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.
- Метод згладженої кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 слід використовувати як бланк.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 мкг/л.

**ПРИМІТКА:** 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися.

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (А), отриманих для кожного СЕА калібратора проти відповідної концентрації СЕА (в мкг/л). Невідомі концентрації СЕА потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Якщо зразок дає значення СЕА більше 75 мкг/л, необхідно розбавити його в співвідношенні 1/10 та 1/100 нульовим стандартом.

1:10 розбавлення = 50 мкл зразка + 450 мкл СЕА 0 Калібратора.

1:100 розбавлення = 50 мкл розведеного 1:10 + 450 мкл СЕА 0 Калібратора.

Концентрація СЕА в нерозбавлених зразках розраховується наступним чином:

Розбавлення 1/10: 10 x виміряне значення,  
Розбавлення 1/100: 100 x виміряне значення.

## Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (мкг/л)	Середнє абс. значення (А)	СЕА мкг/л
Калібратор 0	0	0.050	
Калібратор 2	2	0.131	
Калібратор 5	5	0.259	
Калібратор 15	15	0.657	
Калібратор 50	50	1.857	
Калібратор 75	75	2.519	
Зразок А		0.220	4.1
Зразок В		1.290	32.3

Малюнок (Див. оригінал інструкції).

## ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні СЕА не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір СЕА не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і СЕА-тест не повинен замінювати інші клінічні дослідження.

Антитіла анти-реагенту (людське антитіло анти-миші (НАМА) або гетерофільні антитіла) у зразку пацієнта можуть іноді заважати аналізу, навіть якщо специфічні блокуючі агенти включені в буфері.

## ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення СЕА визначались для 95 донорів крові і 117 здорових індивідуумів у віці 60-64 роки. Нижня і верхня межі діапазону в нормі були досліджені при використанні рекомендованої непараметричної статистичної обробки. Контрольний інтервал містить центральну 95% фракцію контрольної області. Контрольні межі відповідно можуть бути оцінені як 2.5% (нижня) і 97.5% (верхня) фракції. Ці межі відокремлюють 2.5% фракцію значень в кожному залишку контрольної області. Непараметричні оцінки:

	Середнє, мкг/л	SD, мкг/л	Медіана, мкг/л	Діапазон, мкг/л	Верхня референтна межа Центральна 95% фракція)
Здорові донори крові n=95	1.3	1.0	1.0	0.5-9.1	3.2 мкг/л
Здорові індивідууми 60-64 роки, n=117	2.4	1.7	1.9	0.5-88	7.4 мкг/л

96% здорових суб'єктів продемонстрували значення нижче 5 мкг/л. Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила свій власний діапазон нормальних значень з урахуванням локальних факторів навколишнього середовища, таких як харчування, клімат, умови життя, відбір пацієнтів і т.д.

## ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрації пулованої замороженої сироватки з додаванням людського СЕА та двох різних комбінацій реагентів. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів поспіль. Відтворюваність показана в таблиці:

Зразок	N	Середнє конц. мкг/л	В аналізі SD, мкг/л	В аналізі CV, %	Між днями SD, мкг/л	Між днями CV, %
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

### Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору склала < 0.25 мкг/л і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового Калібратора плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times \text{SD Калібратора 0}}{\text{OD Калібратора 2} - \text{OD Калібратора 0}} \times 2 \text{ мкг/л}$$

### Відновлення

Насичені зразки сироватки готували додаванням людського антигену СЕА до нормальних зразків сироватки. Відновлення антигену було в межах 90-115%.

### Хук-ефект

При зчитуванні ОЩ на довжині хвилі 405 нм, наприклад, при проведенні аналізу з додаванням Стоп розчину, хук-ефект не спостерігався для зразків із вмістом до 250 000 мкг/л. Коли ОЩ зчитується на довжині хвилі 620 нм, зразки з дуже високим вмістом СЕА можуть змінювати колір субстрату з синього на зеленуватий. Це може призвести до хибно низьких ОЩ, які попадають в діапазон калібрувальної кривої, і визначаються як хук-ефект спостерігався в зразках, що містять більше ніж 2000 мкг/л СЕА.

Для того, щоб уникнути хибно низьких результатів через хук-ефект при зчитуванні ОЩ при 620 нм, рекомендується використання Альтернативної опції проведення аналізу і визначення ОЩ при 405 нм для пацієнтів, які аналізуються вперше або для пацієнтів, для яких очікуються дуже високі значення СЕА.

### Лінійність розведення

Зразки пацієнтів були розбавлені Калібратором 0 і проаналізовані. Отримані значення знаходилися в межах 90-120% від очікуваних значень.

### Специфічність

	Концентрації з незначною інтерференцією (± 10 %)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	5 мг/мл

### ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ

Набір CanAg CEA EIA порівнювався з набором Wallac Delfia CEA. 77 зразків людської сироватки з діапазоном значень 0-790 мкг/л були аналізовані і отримано рівняння лінійної регресії:

$$\text{CanAg CEA} = 0.90 \times \text{Delfia CEA} + 0.53 \quad r = 1.00$$

## **ГАРАНТІЯ**

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних, припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії товарного стану та придатності для використання.



### **ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

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