



**Набор ИФА
для количественного определения в
сыворотке человека
РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА
(СЕА)**

Кат. № : KP231W
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 10-2003

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это набор основан на методе иммуноферментометрического анализа (ИФМА). Используются трое различных моноклональных антител анти-СЕА, двое нанесено на лунки, а третье конъюгировано с пероксидазой хрена. В течение первой инкубации СЕА, присутствующий в калибраторах и образцах, связывается сразу с моноклональными антителами, формируя многослойный материал типа «сэндвич». После этой инкубации свободный материал удаляется циклом аспирации/промыывания. Остаточная ферментная активность, обнаруживаемая в лунках, будет таким образом прямо пропорциональной концентрации СЕА в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМБ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм.

РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПОДГОТОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона

- 1. Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (мишиним) анти-СЕА. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой пакете тщательно закрытыми.
- 2. Калибратор:** 6 флаконов СЕА в основе сыворотки. Лиофилизированные, следующие концентраций: 0, 5, 10, 20, 50 и 100 нг/мл. Консервант: неомидин Растворить калибраторы 1 мл дистиллированной воды. После растворения хранить при 2-8°C 7-10 дней; при более длительном хранении заморозить при -20°C.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- 3. Ферментный конъюгат:** 2 флакона (12 мл) моноклонального анти-СЕА антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) в Tris-HCl, BSA и стабилизаторами. Консервант: неомидин и тимеросал (<0.05%).
- 4. Контрольная сыворотка:** 1 флакон СЕА в основе сыворотки. Лиофилизированная. Консервант: неомидин Растворить 1 мл дистиллированной воды. После растворения хранить при 2-8°C 7-10 дней; при более длительном хранении заморозить при -20°C.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- 5. Разбавитель образца:** 1 флакон (10 мл) с фосфатным буфером, BSA и стабилизаторами. Консервант: неомидин и тимеросал (<0.05%).
- 6. Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов перерастворите раствор, поместив флакон на несколько минут в температуру 37°C. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.
- 7. Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером и ДМСО. Готовый к использованию.

- 8. Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готовый к использованию.
Примечание: Чтобы получить раствор субстрата смешайте в стеклянной таре равные порции хромогена и субстратного буфера. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течении 1 часа после подготовки.
- 9. Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
 - Самоклеющаяся пленка.
 - Полиэтиленовый пакет.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Ручной анализ

- Автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерная колба.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 1200 об/мин.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 нм.
- Миллиметровочная графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте реагенты из различных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/- 2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.

- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы в равных частях до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

Образцы с концентрациями CEA более чем 100 нг/мл необходимо разбавить разбавителем образца. Рекомендуется проводить разбавление в соотношении 1:20 (10 мкл сыворотки + 190 мкл разбавителя образца).

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
- 1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
- 2. Раскапайте **20 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца в соответствующие лунки.
- 3. Добавьте **200 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка.
- 4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
- 5. Инкубируйте лунки в течении **30 мин. при КТ** на орбитальном шейкере при 1200 об/мин.
- 6. Удалите пленку и осторожно аспирируйте инкубационную смесь из всех лунок.
- 7. Промойте лунки **4 раза 300 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
- 8. Раскапайте **200 мкл** предварительного подготовленного раствора субстрата (см. раздел реагентов) в каждую лунку.
- 9. Инкубируйте **15 мин. при КТ** на орбитальном шейкере при 1200 об/мин., избегайте прямого солнечного света.
- 10. Раскапайте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 11. Считайте ОП желательно бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **1 часа** после завершения анализа.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 в оригинале инструкции).

РАССЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при длине трех волн: 450, 405 и 620 нм, таким образом расширяя диапазон кривой.

Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибраторов (ось x) напротив абсорбции каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации CEA в нг/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочную кривую; в случае разбавленных образцов умножьте на коэффициент разбавления.

ПРИМЕР РАССЧЕТА

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных данных.

Описание (нг/мл)	Абсорбция	CEA
Калибратор 0	0.008	
Калибратор 5	0.128	
Калибратор 10	0.274	
Калибратор 20	1.613	
Калибратор 50	1.390	
Калибратор 100	2.320	
Образец	0.550	18 нг/мл

ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы.

Некурящие:	до 5 нг/мл (95%)
Курящие:	до 8 нг/мл

Критерии достоверности:

Перед началом расчета результатов убедитесь, что концентрация контрольной сыворотки находится в пределах значения, указанного в листе Сертификата Качества.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Специфичность

Настоящий метод показал следующие перекрестные реакции: 100 % с CEA, ниже чем 0.02 % с ТСГ и меньше чем 0.01 % с ХГЧ и ФСГ.

Никакие перекрестные реакции не наблюдались с CEA-подобными веществами, обнаруженных в здоровых тканях.

Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение + 3 CO). Эта доза составляет **0,5 нг/мл**.

Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения вариабельность внутри и между анализами в 3 сыворотках при разных концентрациях CEA.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	53.7	2.2	4.1	10
B	29.7	0.9	3.0	10
C	17.4	1.0	5.7	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	55.5	3.3	5.9	10
B	31.5	2.8	8.9	10
C	17.9	1.6	8.9	10

Соответствие

Проверена при использовании анализов на восстановление и параллелизм.

Испытание на восстановление

Известные количества CEA были добавлены к сыворотке нормы и проанализированы.

Добавлено (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)	Восстановление %
S1	---	1.0	----
S1 + 80	81	71.5	88.2
S1 + 40	41	43.0	104.8
S1 + 20	21	22.0	104.7
S1 + 10	11	11.0	100.0
S1 + 5	6	6.5	108.3

Испытание на параллелизм

Сыворотка с высокой концентрацией СЕА была проверена нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)
S1 неразбавл.	---	92.0
1:2	46.0	44.2
1:4	23.0	22.0
1:8	11.5	12.0

«ХУК-ЭФФЕКТ»

Всякий раз, когда образцы с очень высокими концентрациями антигена анализируются неразбавленными в двухэтапном «сэндвич»-методе, как в этом наборе, "хук-эффект" может дать значения концентраций явно ниже чем фактические значения. Этот набор не дает "хук-эффекта" при концентрации до 2500 нг/мл.

Рекомендуется подтвердить патологические значения СЕА (> 10 нг/мл) вторым анализе при правильном разведении образца.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Иммунодиагностические наборы, использующие мышинные моноклональные антитела могут причинять пере- или недооценку по образцам, обработанным мышинными моноклональными антителами. Такие образцы могут содержать высокие уровни человеческих анти-мышинных антител и не должны исследоваться этим набором.

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.com
www.diameb.ua