

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОЕМБРІОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА НОВОГО ПОКОЛІННЯ МЕТОДОМ ІФА

## Next Generation Carcinoembryonic Antigen (CEA-Next Gen) Test System

Кат. №: 4625-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019

Версія: 3



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

### 1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

**Застосування за призначенням:** Кількісне визначення концентрації Раковоембріонального антигену (CEA) у сироватці крові людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

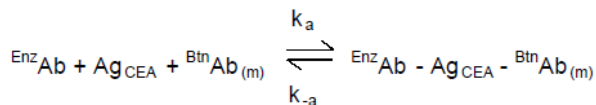
### 2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

### 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 моноклональні антитіла до РЕА.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

$\text{Ag}_{\text{CEA}}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

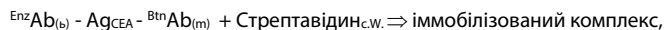
$\text{EnzAb}$  = ферментно-мічене моноклональне антитіло (надлишкова кількість)

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

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

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



Стрептавідин<sub>c.w.</sub> = Стрептавідин, нанесений в лунки

Імобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею 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 РЕА Наступної генерації - 1 мл/флакон

6 флаконів референсного матеріалу для антигена РЕА з концентраціями 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 100 (E) і 250 (F) нг/мл (ng/ml). Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

**Примітка:** Стандарти, засновані на людській сироватці, були відкалібровані при використанні референсного препарату, аналізованого проти 1-го Міжнародного референсного препарату (IRP № 73/601).

#### B. Ферментний Реагент РЕА Наступної генерації - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить фермент-мічене антитіло і біотинильоване моноклональне IgG миші в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### C. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### E. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### F. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

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

#### G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

#### 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 °C (°C). 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. Дозатор зі здатністю подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) і 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

#### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений 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, ВГС 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 проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

#### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка за типом, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. 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 отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка натще.

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

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. 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 буфер

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

**Зауваження 1:** Не використовуйте робочий субстрат, якщо він придбає блакитне забарвлення.

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

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

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

- Виберіть необхідну кількість лунок для кожного калібратора, контролю та зразка для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) калібратора, контролю та зразка у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Ферментного реагенту РЕА в кожен лунку. Дуже важливо вносити всі реагенти близько до дна лунки.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрийте пластиковою плівкою.
- Інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (µl) 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 пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) 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 (µl) 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 (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

## 10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації РЕА в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації РЕА в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації РЕА в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.320 перетинає стандартну криву при 18.1 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

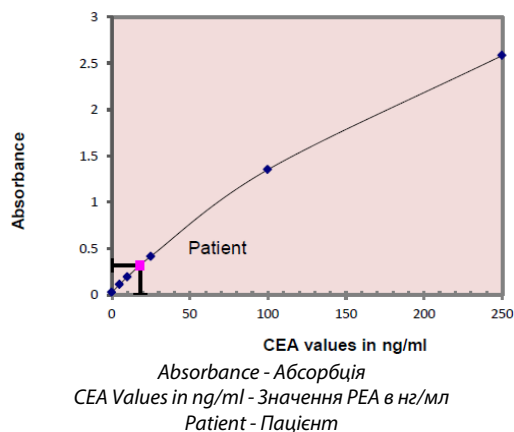
**Примітка:** Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для аналізу ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

ID зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація нг/мл (ng/ml)
Калібратор А	A1	0.028	0.027	0
	B1	0.026		
Калібратор В	C1	0.115	0.115	5
	D1	0.114		
Калібратор С	E1	0.196	0.196	10
	F1	0.196		
Калібратор D	G1	0.432	0.418	25
	H1	0.404		
Калібратор Е	A2	1.403	1.353	100
	B2	1.303		
Калібратор F	C2	2.580	2.558	250
	D2	2.535		
Пацієнт	E2	0.302	0.320	18.1
	F2	0.337		

\*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 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  $\geq 1.3$ .
- Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

### 12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентраціями PEA вище 250 нг/мл (ng/ml) можуть бути розведені (наприклад 1/10 або вище) з нормальною чоловічою сироваткою (CEA < 5 нг/мл (ng/ml)) і знову аналізовані. Концентрація зразка отримується шляхом множення результату на коефіцієнт розведення (10).
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.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. 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.
13. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/EC IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ІФА були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. **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.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. PEA має низьку клінічну чутливість та специфічність в якості пухлинного маркера. Клінічно **підвищені значення PEA поодиночі не мають діагностичного значення в якості тесту на рак** і повинні бути використані тільки в поєднанні з іншими клінічними проявами (спостереженнями) і діагностичними параметрами. Є пацієнти з колоректальним раком, у яких не виявляють підвищені значення PEA і підвищені значення PEA не завжди змінюються з прогресуванням або регресією хвороби. Курці демонструють більш високий діапазон вихідних значень, ніж некурці.

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Майже 99% з некурюючих мають концентрації PEA менше 5 нг/мл (ng/ml). Аналогічно 99% курців мають концентрації менше 10 нг/мл (ng/ml).

Таблиця 1

Очікувані значення для Тест-системи PEA Next Generation AccuBind® ІФА	
Не курці	< 5 нг/мл (ng/ml)
Курці	10 нг/мл (ng/ml)

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірених і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому знаходиться лабораторія.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність Тест-системи PEA Next Generation AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контрольних 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 (ng/ml))

Зразок	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	20	2.6	0.25	9.6
Рівень 2	20	12.5	1.01	8.1
Рівень 3	20	24.1	1.35	5.6

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами\* (нг/мл (ng/ml))

Взорець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	2.8	0.30	10.7
Рівень 2	10	12.8	1.18	9.2
Рівень 3	10	23.5	1.85	7.8

\*Вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

### 14.2 Чутливість

Тест-система PEA Next Generation AccuBind® ІФА має чутливість 0.025 нг (ng). Це еквівалентно зразку, що містить 1 нг/мл (ng/ml) концентрації PEA. Чутливість визначали шляхом визначення мінливості калібруатора «0 нг/мл (ng/ml)» та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

### 14.3 Достовірність

Тест-систему PEA Next Generation AccuBind® ІФА порівнювали з референсним методом. Аналізували біологічні зразки нормальної і підвищеної концентрацій. Загальна кількість таких зразків була 64. Значення варіювалися від 0.4 до 128 нг/мл (ng/ml). Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для методу PEA AccuBind® ІФА в порівнянні з референсним методом. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Monobind (X)	10.01	Y=1.17+0.977 (X)	0.995
Референсний (Y)	9.04		

### 14.4 Специфічність

Високоспецифічні антитіла до молекул PEA були використані в Тест-системі PEA Next Generation AccuBind® ІФА. Перехресної реактивності не було виявлено при додаванні великої кількості наступних речовин в пул сироватки людини.

Субстанція	Концентрація
Ацетилсаліцилова кислота	100 мкг/мл (µg/ml)
Аскорбінова кислота	100 мкг/мл (µg/ml)
Кофеїн	100 мкг/мл (µg/ml)
АФП	10 мкг/мл (µg/ml)
ПСА	1.0 мкг/мл (µg/ml)
СА-125	10000 О/мл (U/ml)
ХГЛ	1000 МО/мл (IU/ml)
ЛГ	10 МО/мл (IU/ml)
ТТГ	100 мМО/мл (IU/ml)
ПРЛ	100 мкг/мл (µg/ml)

#### 14.5 Лінійність і Хук-Ефект

Реагенти з трьох різних лотів були використані для оцінки лінійності і хук-ефекту. Масивні концентрації РЕА (> 60000 нг/мл (ng/ml)) були використані для лінійних розведень в об'єднаній людській сироватці пацієнта.

Тест не показав хук-ефекту при концентрації до 60000 нг/мл (ng/ml) і в межах дози відновлення від 92.0 до 111.4%.



#### ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поінт Драйв</i>
<i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i>	<i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i>
<i>Phone: 949.951.2665</i>	<i>Тел.: 949.951.2665</i>
<i>Fax: 949.951.3539</i>	<i>Факс: 949.951.3539</i>
<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>	<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

