

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВОЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (СЕА)

1825-300, Carcinoembryonic Antigen (CEA) Test System

Каталог. № : 1825-300

Методика от 06-07-2012

Количество : 96

Версия 3

Производитель: **Monobind (США)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Раковоэмбрионального Антигена (СЕА) в человеческой сыворотке.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Раковоэмбриональный антиген, (СЕА) – гликопротеин с молекулярным весом 180 кДа. СЕА является первым открытым в 1965 г. Голд и Фридманом раковоэмбриональным белком. СЕА является наиболее используемым маркером гастроинтестинального рака.

Хотя СЕА первично ассоциируется с колоректальным раком, другие опухоли могут приводить к повышению уровней СЕА, включая опухоли груди, легких, желудка, поджелудочной железы, яичников и других органов. Также значительно выше нормальных показателей получают при воспалении легких или ЖКТ и доброкачественных опухолях печени. В заядлых курильщиков, как группы, базовая концентрация СЕА также выше нормы.

В этом методе Стандарты СЕА, пробы пациента или контроли сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляются биотинилированные моноклональные антитела и фермент-меченые антитела (направленные против разных эпитопов СЕА), (конъюгат), и реагенты перемешиваются. Реакция между различными СЕА -антителами и нативным СЕА образует сэндвичевый комплекс, который связывается со стрептавидином в ячейках.

После завершения необходимого инкубационного периода антитела, связанные с конъюгатом, отделяются от несвязавшегося конъюгата промывкой. Активность фермента на поверхности ячеек измеряется реакцией с подходящим субстратом.

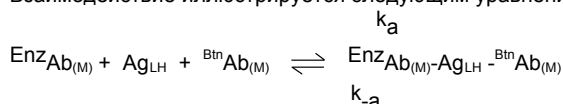
Использование стандартов СЕА с известными различными концентрациями позволяет построить калибровочную кривую. Концентрации СЕА в неизвестных образцах находят по этой калибровочной кривой.

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммуоферментный анализ (тип 3)

Настоящие реагенты, необходимые для иммуоферментного определения, включают в избытке высокоаффинные и специфичные антитела (фермент-меченые и биотинилированные) для специфического распознавания различных эпитопов, и естественный антиген. В процессе анализа на поверхности микроячеек взаимодействуют сорбированный в ячейках стрептавидин и добавляемые биотинилированные анти-СЕА антитела.

При смешивании биотинилированных анти-СЕА моноклональных антител, ферментного конъюгата и сыворотки, содержащей естественный антиген, между нативным антигеном и антителами происходит реакция без конкуренции или пространственных затруднений с образованием растворимого сэндвич-комплекса. Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)}$ = биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество)

Ag_{LH} = нативный антиген (переменное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}$ = фермент-меченые моноклональные антитела (избыточное количество)

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{LH}\text{-B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)}$ = сэндвичевый комплекс антиген-антитело

k_a = константа скорости ассоциации

k_{-a} = константа скорости диссоциации

Одновременно в ячейках образуется комплекс при реакции высокоаффинного взаимодействия стрептавидина и биотинилированных антител. Это взаимодействие иллюстрируется так:

$\text{EnzAb}_{(M)}\text{-Ag}_{LH}\text{-B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(M)} + \text{стрептавидин}_{C.W.} \Rightarrow \text{имм. Комплекс}$

$\text{стрептавидин}_{C.W.}$ = стрептавидин, иммобилизованный на ячейках
Имм.(обилизованный) комплекс = сэндвич-комплекс, связанный с твердой поверхностью.

После достижения равновесия фракция, связанная с антителами, отделяется от несвязавшихся антигенов декантацией или аспирацией и последующей промывкой. Активность фермента во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

A. Раковоэмбриональный Антиген (СЕА)- 1 мл/флакон - значки A-F

6 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями СЕА 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) и 250 (F) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.

Замечание: Стандарты на основе человеческой сыворотки калиброваны по референс-препарату, исследованному по 1-му международному референс-препарату (IRP # 73/601).

B. Ферментный Реагент СЕА – 13 мл/флакон - значок E

Один флакон, содержащий фермент-меченные антитела, биотинилированные моноклональные мышиные IgG специфические к СЕА в буфере, краситель и консервант. Хранить при 2-8°C.

C. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок J

Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запечатанный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.

D. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок K

Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.

E. Субстрат A - 7 мл/флакон - значок S^A

Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.

F. Субстрат B - 7 мл/флакон - значок S^B

Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.

G. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок STOP

Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.

H. Инструкция к набору.

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

Замечание 3: Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозатор на 25, 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка
4. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
5. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
6. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
7. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
8. Таймер
9. Контрольные материалы

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*
Не для внутреннего или наружного использования на людях
или животных**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка

протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, NHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служит сыворотка крови. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу. Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.020 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

1. Буфер для промывок

Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.

2. Рабочий субстратный раствор

Смешайте Субстраты, вылив содержимое коричневого флакона с Субстратом А во флакон Субстрат В. Закройте смесь желтой крышкой для легкой идентификации. Перемешайте смесь и подпишите флакон «Рабочий раствор субстрата». Раствор хранится при 2-8 °C.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
2. Добавьте по 0.025 мл (25 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте по 0.100 мл (100 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку. **Важно вносить все реагенты близко ко дну лунок микропланшета.**
4. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
7. Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел «Приготовление реагентов») и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
8. Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. «Приготовление реагентов»). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

9. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.

10. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
11. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации СЕА в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации СЕА в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите концентрацию СЕА в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция (0.392 Abs) пересекает стандартную кривую при 22.5 нг/мл (см. рис.1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (А)	Среднее абсорбции (В)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	0.017	0.018	0
	B1	0.019		
Калибратор В	C1	0.160	0.159	5
	D1	0.159		
Калибратор С	E1	0.231	0.227	10
	F1	0.224		
Калибратор D	G1	0.431	0.424	25
	H1	0.418		
Калибратор E	A2	0.776	0.770	50
	B2	0.763		
Калибратор F	C2	2.851	2.866	250
	D2	2.880		
Образец	E2	0.398	0.391	22.5
	F2	0.384		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1

(См. оригинал инструкции).

11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Калибратора F должна быть ≥ 1.3
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
4. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
5. Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
6. Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
7. Плохая промывка ячеек может приводить к невоспроизводимым результатам.
8. Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.

9. Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
10. Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
11. Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
12. Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных *Monobind Inc.*, может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

1. **Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
2. Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализам.
3. Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
4. **Производитель не несет ответственности за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.**
5. Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции, ожидаемые значения при использовании данного метода приведены в таблице 1:

ТАБЛИЦА 1
Ожидаемые значения для СЕА, нг/мл

Некурящие	< 5 нг/мл	Курящие	< 10 нг/мл
-----------	-----------	---------	------------

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	20	4.8	0.35	7.3
Уровень 2	20	21.7	1.35	6.2
Уровень 3	20	60.5	3.58	5.9

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (нг/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	10	5.0	0.41	8.2
Уровень 2	10	21.2	1.25	5.9
Уровень 3	10	59.5	3.15	5.3

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 0.025 нг. Это эквивалентно образцу с концентрацией 1 нг/мл для данного набора. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (нг/мл) плюс 2σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным радиоиммуноанализом методом. Использовались образцы от нормальных и беременных женщин. Общее число образцов было 110. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для данного метода в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	5.67	Y = -0.1164 + 1.0324 (x)	0.935
Метод сравнения	5.75		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Для оценки специфичности антител использовались массивные концентрации возможных перекрестно-реагирующих веществ при добавлении к известным сывороточным пулам и исследованы параллельно с базовой сывороткой. Не найдено перекрестной реактивности. Данные приведены в таблице ниже.

Аналит	Внесенное количество
Ацетилсалициловая кислота	100 мкг/мл
Аскорбиновая кислота	100 мкг/мл
Кофеин	100 мкг/мл
АФП	10 мкг/мл
ПСА	1.0 мкг/мл
СА-125	10000 Ед/мл
ХГЧ	1000 МЕд/мл
чЛГ	10 МЕд/мл
чТТГ	100 мМЕд/мл
Пролактин	100 мкг/мл

14.5 Линейность и Хук-эффект

Для исследования линейности и Хук-эффекта использовали 3 разных лота набора. Массивные концентрации СЕА (более 60000 нг/мл) использовались для линейных разведений в пуллированной человеческой сыворотке пациентов.

Тестирование показало отсутствие Хук-эффекта вплоть до концентрации 60,000 нг/мл и в дозозависимом восстановлении от 92.0% до 111.4%.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com