

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОЕМБРІОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ІФА

## Carcinoembryonic Antigen (CEA) Test System

Кат. №: 1825-300A

Дата випуску інструкції: 04-10-2021

Версія: 5



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 раковоембріонального антигена (CEA) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу.

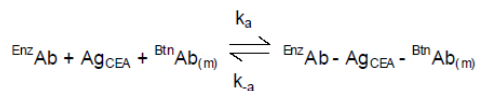
**2.0 РЕЗЮМЕ І ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані), з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні лунки мікропланшета шляхом взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунки, та екзогенно доданого біотинильованого моноклонального анти-CEA антитіла.

При змішуванні моноклонального біотинильованого антитіла, міченого ферментом антитіла і сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілами, без конкуренції або стеричних перешкод, з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

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

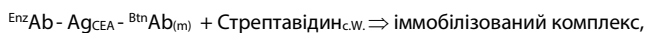
$\text{EnzAb}$  = Ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

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

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

Одночасно комплекс осаджується в лунку через реакцію високої спорідненості стрептавідину та біотинильованого антитіла. Ця взаємодія проілюстрована нижче:



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

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

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. Раковоембріональний антиген (PEA) - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсного антигена PEA з рівнями 0(A), 5(B), 10(C), 25(D), 50(E) і 250(F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

**Зауваження:** Калібратори на основі людської сироватки калібровані за референс-препаратом, дослідженим за 1-м міжнародним референс-препаратом (IRP № 73/601).

#### B. Ферментний реагент PEA - 13 мл (мл)/флакон

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

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

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

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

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 2-30 °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 при 2-8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного 96-лункового планшета.

#### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторюваних поставок об'ємом 0.100 мл (ml) та 0.350 мл (ml) з точністю вище 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Абсорбуючий папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Матеріали для контролю якості.

### 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, 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 проводитися відповідно до місцевих нормативно-законодавчих вимог.

#### 6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки 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 (mg)/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 (°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 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 Буфер

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

### 2. Робочий Субстратний розчин

Влийте вміст бурштинової флакону з написом «А» у прозорий флакон з написом «Розчин» В». Покладіть жовтий ковпачок на прозорий флакон для легкої ідентифікації. Змішайте та позначте відповідним чином. Зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).

**Зауваження 1:** Не використовуйте субстрат, якщо він набув блакитного забарвлення.

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

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

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

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсу, контролю та зразка пацієнта для аналізу в двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 0.025 мл (ml) (25 мкл (µl)) сироваткового референсу, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Ферментного реагенту PEA у кожну 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 абсорбуючому папері, якщо використовувалася декантація.
- 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 кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Робочого розчину субстрату в кожну 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 кожну лунку 0.050 мл (ml) (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 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації PEA в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

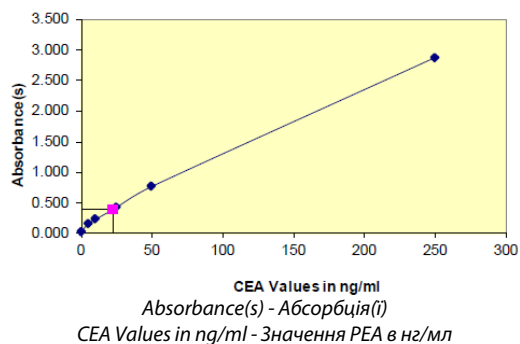
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації PEA в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Щоб визначити концентрацію PEA для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитайте концентрацію (у нг/мл (ng/ml)) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (0.391 Abs) перетинає криву реакції на дозу при концентрації PEA (22.5 нг/мл (ng/ml)) (див. Малюнок 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

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл (ng/ml))
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		

Малюнок 1



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

## 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 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 тривати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу.
- 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 РЕА понад 250 нг/мл (ng/ml) необхідно розвести (наприклад, 1:10 або вище) нормальною сироваткою (РЕА < 5 нг/мл (ng/ml)) 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 - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС щодо маркування CE - для цього та інших пристроїв, виготовлених компанією Monobind, можна отримати на електронну пошту надіславши запит на адресу [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 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.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися 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 розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- РЕА має низьку клінічну чутливість і специфічність як раковий маркер. **Клінічно підвищене значення РЕА 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 РЕА, а підвищені значення РЕА не завжди змінюються з прогресуванням або регресом захворювання. Курці демонструють більш високий діапазон базових значень, ніж не курячі.

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Близько 99% не курячих мають концентрації РЕА нижчі 5 нг/мл (ng/ml). Так само, 99% курячих мають концентрації нижчі 10 нг/мл (ng/ml).

**ТАБЛИЦЯ 1**  
Очікувані значення для тесту РЕА

Не курячі	< 5 нг/мл (ng/ml)	Курячі	< 10 нг/мл (ng/ml)
-----------	-------------------	--------	--------------------

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної 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 залежить від діапазону очікуваних значень, встановлених Виробником, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон за методом, з населенням, корінним для району, в якому знаходиться лабораторія.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність Тест-системи РЕА AccuBind® ІФА була визначена шляхом аналізу на шести різних рівнях контрольного пулу та сироваток пацієнтів. Середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 2.

**ТАБЛИЦЯ 2**

Дані точності для Тест-системи РЕА

Зразок	Середнє значення нг/мл (ng/ml)	Точність в аналізі		Загальна точність (n=80)	
		SD	CV%	SD	CV%
Контроль 1	5.6	0.29	5.19	0.76	13.62
Контроль 2	23.9	1.03	4.30	2.02	8.45
Контроль 3	50.2	1.71	3.41	3.80	7.57
Пацієнт 1	13.8	0.74	5.37	1.62	11.75
Пацієнт 2	63.5	1.90	2.99	5.80	9.13
Пацієнт 3	121.6	6.65	5.47	16.19	13.32

\*Вимірювання проводились в 40 експериментах в дублях протягом 20 днів.

### 14.2 Чутливість

Тест-система РЕА AccuBind® ІФА має LoB = 0.499 нг/мл (ng/ml) і LoD = LoQ = 0.816 нг/мл (ng/ml).

### 14.3 Достовірність

#### 14.3.1 Лінійність

Лінійність Тест-системи РЕА AccuBind® ІФА була перевірена шляхом розведення зразків сироватки людини, що містять високі рівні СЕА (62-269 нг/мл (ng/ml)), зі зразками сироватки людини з низьким РЕА (< 1 нг/мл (ng/ml)). Результати підтверджують, що існує лінійність у різних підготовках зразків у всьому діапазоні тесту до 269 нг/мл (ng/ml).

#### 14.3.2 Відновлення

Відновлення Тест-системи РЕА AccuBind® Microplate ІФА було розраховано для п'яти зразків пацієнтів, насичених різними рівнями РЕА до 225 нг/мл (ng/ml). Було визначено, що відновлення знаходиться в межах 15% від очікуваних значень для всіх зразків.

#### 14.3.3 Порівняння методів

Тест-систему РЕА AccuBind™ ІФА порівнювали з референсним ІФА методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з нормальними і підвищеними концентраціями. 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 (X)	5.67	Y=-0.1164 + 1.0324 (x)	0.935
Референсний (Y)	5.75		

### 14.4 Специфічність

Високоспецифічні антитіла до молекул РЕА були використані в Тест-системі РЕА AccuBind™ ІФА. Не було виявлено інтерференцій в роботі РЕА AccuBind™ ІФА після додавання великої кількості наступних речовин до пулу людської сироватки.

**ТАБЛИЦЯ 5**

Субстрат	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 (mIU/ml)
Пролактин	100 мкг/мл (µg/ml)

#### 14.5 Хук-ефект високої дози

Хук-ефект високої дози СЕА AccuBind® ІФА оцінювали за допомогою кількох зразків, що містять значні концентрації РЕА (> 60000 нг/мл (ng/ml)). Тестування показало відсутність Хук-ефекту аж до концентрації 60000 нг/мл (ng/ml).



#### 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)

