

НАБІР РЕАГЕНТІВ

КАРЦИНОЕМБРИОНАЛЬНИЙ АНТИГЕН ELISA

CEA ELISA

Каталог. №: **EIA-1868**

Дата випуску інструкції: **2019/08**
Версія **6.0**



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

1. ВСТУП

1.1 Призначення

DRG CEA ELISA – це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання раково-ембріонального антигену (PEA) у сироватці або гепаринової плазмі.

1.2 Короткий опис та пояснення

Раково-ембріональний антиген (PEA) – це 200 кДа глікопротеїн. Клітини, які виробляють PEA, включають цей глікопротеїн у свої мембрани клітин і вивільняють його в кров. Таким чином, PEA можна виявити як у клітинах, так і в рідинах організму.

Нормальні значення, як правило, становлять < 5 нг/мл.

Пухлини, які пов'язані зі збільшенням значень PEA:

Рак товстої кишки, рак шлунку, рак молочної залози, рак легенів, рак підшлункової залози, рак стравоходу.

Найважливіша роль PEA полягає в раку товстої кишки, оскільки рівень PEA корелює зі стадією пухлини.

2. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Набір DRG CEA ELISA – це твердофазний ферментно-зв'язаний імуносорбентний аналіз (ELISA), який базується на **принципі «сандвіча»**. Мікротитрові лунки покриті моноклональним антитілом, спрямованим у напрямку до унікального антигенного сайту молекули PEA. Аліквота зразка пацієнта, що містить ендogenous PEA, інкубується у покритій лунці з ферментним кон'югатом, який є антитілом до PEA, кон'югованим з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат змивають. Кількість пов'язаного кон'югату пероксидази пропорційна концентрації PEA у зразку.

Додавши розчин субстрату, інтенсивність утвореного кольору пропорційна концентрації PEA у зразку пацієнта.

3. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набір призначений для використання в *in-Vitro* діагностиці. Тільки для професійного використання.
- Всі реагенти цього набору, які містять людську сироватку або плазму були протестовані і виявлені негативними на ВІЛ 1/2, HbsAg та HCV FDA схваленими процедурами. Всі реагенти, проте, слід вважати потенційно небезпечними під час використання та утилізації.
- Перед початком аналізу, прочитайте інструкцію повністю та уважно. Використовуйте дійсну версію інструкцій для використання. Запевніться, що все зрозуміло.
- Мікропланшет містить відривні смужки. Не використовувати лунки потрібно зберігати при температурі від 2 до 8 °C у герметично закритій упаковці та використати до зазначеного терміну.
- Піпетування зразків та реагентів необхідно проводити якомога швидше і в одній послідовності.
- Використовуйте резервуари тільки для одних реагентів. Це особливо стосується резервуарів для субстрату. Використання резервуару для розчину субстрату, який попередньо використовувався для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення цього розчину. Не виливайте реагенти назад у пробірки, тому що це може призвести до забруднення реагенту.
- Ретельно змішуйте вміст лунок мікропланшетів, щоб забезпечити хороші результати випробувань. Не використовуйте повторно мікролунки.
- Не допускайте висихання лунок під час аналізу; додавайте реагенти одразу після завершення етапів промивання.
- Дозвольте реагентам досягнути кімнатної температури (21°C до 26°C) перед початком тестування. Температура впливає на показники абсорбції аналізу. Проте, це не впливає на значення для зразків пацієнтів.

- Ніколи не піпетуйте ротом та уникайте контакту реагентів та зразків зі шкірою та слизовими оболонками.
- Не куріть, не їжте, не пийте та не користуйтеся косметикою у місця обробки зразків або реагентів набору.
- Одягайте одноразові латексні рукавички під час обробки зразків та реагентів. Мікробне забруднення реагентів або зразків може дати неправильні результати.
- Обробку потрібно проводити відповідно до процедур національної біологічної безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності вказаного на етикетці набору.
- Дотримуватись всіх визначених об'ємів. Оптимальні результати можна отримати за умови використання калібрувальних піпеток та мікропланшетних зчитувачів.
- Не змішуйте компоненти з наборів з різними номерами лотів. Не рекомендується обмінювати лунки різних планшетів, навіть однакової партії. Набори можуть бути відвантажені або зберігатися в різних умовах, і характеристики зв'язування планшетів можуть дещо відрізнятись.
- Уникайте зі *Стоп розчином*, який містить 0.5 M H₂SO₄. Це може призвести до подразнення шкіри та опіків.
- Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консерванту. У випадку попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
- TMB субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизову. У разі контакту, промийте очі великою кількістю води, а шкіру – водою з милом. Помийте забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні, виведіть людину на свіже повітря.
- Хімікати та приготовлені і використовувані реагенти слід розглядати як небезпечні відходи, відповідно до рекомендацій національної біологічної безпеки.
- За додатковою інформацією зверніться до виробника. Паспорт безпеки хімічної продукції для цього продукту доступний за запитом безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

- Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (відокремлені) смужки, 96 лунок; Лунки покриті антитілом анти-PEA (моноклональне).
- Стандарт 0**, 1 флакон, 3 мл, готовий до використання; Не містить ртутний консервант.
- Стандарт 1-5**, 5 флаконів, 1 мл, готовий до використання; Концентрації: 5 - 10 - 25 - 50 - 100 нг/мл Не містить ртутний консервант.
- Контроль Високий і Низький**, 2 флакони (ліофілізовані), 1 мл кожен (див. «Підготовка реагентів»). Контрольні значення та діапазони дивитися на етикетці флакону або на листку даних КЯ. Не містить ртутний консервант.
- Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання. Моноклональне антитіло анти-PEA кон'юговане пероксидазою хрому. Не містить ртутний консервант.
- Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (TMB).
- Стоп розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.5 M H₂SO₄. Уникайте контакту зі *стоп розчином*. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки.
- Промиваючий розчин**, 1 флакон, 30 мл (40x концентрований), Див. «Підготовка реагентів».

Примітка: Додатковий *Стандарт 0* для розведення зразка доступний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, які не постачаються

- Мікропланшетний зчитувач (450 нм, з референсною довжиною хвилі при 620 нм – 630 нм) (напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Калібровані змінні прицезійні мікропіпетки.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована та деіонізована вода.
- Таймер.
- Лінійний графічний папір або програмне забезпечення для зменшення даних.

4.3 Умови зберігання

При температурі зберігання від 2 до 8°C, закриті реагенти будуть зберігатися реактивність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну. Відкриті реагенти потрібно зберігати при температурі від 2 до 8°C. Мікротитрові лунки потрібно зберігати при температурі від 2 до 8°C. Після відкриття упаковки, потрібно знову її щільно закрити.

Відкриті набори зберігають активність протягом двох місяців, за умови зберігання так, як описано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та необхідну кількість смужок до кімнатної температури.

Контроль

Розведіть ліофілізований вміст 1.0 мл дистильованої води і залишіть мінімум на 10 хвилин. Перемишайте контроль кілька разів перед використанням.

Примітка: Приготовлений контроль слід розділити на порції та зберігати при -20 °С.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40X концентрованого промивного розчину.

Розведіть 30 мл концентрату *Промивного Розчину* з 1170 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл.

Розведений Промивний розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію потрібно здійснювати відповідно до національних вимог. Всю необхідну інформацію про цей продукт ви можете знайти у Паспорті безпеки.

4.6 Пошкоджені тестові набори

У випадку пошкодження тестових наборів або компонентів, необхідно повідомити про це компанію DRG у письмовій формі не пізніше 1 тижня після отримання набору. Не рекомендується використовувати пошкоджені набори у тестуванні. Їх слід зберігати до отримання остаточного рішення, а пізніше утилізувати відповідно до офіційних вимог.

5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

В даному аналізі можна використовувати сироватку або гепаринову плазму.

Не рекомендується використовувати гемолітичні, іктеричні або ліпемічні зразки.

Примітка: Зразки, які містять азид натрію не потрібно використовувати у цьому аналізі.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Зробити забір венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дайте згуститися, і відділіть сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугувати, поки кров повністю не згуститься. Зразки пацієнтів, які проходять антикоагулянтну терапію, потребують більше часу для згортання.

Плазма:

Цільну кров потрібно зібрати у пробірки центрифуги, які містять антикоагулянт (напр. Sarstedt Monovette з відповідно підготовленою плазмою) та центрифугувати негайно після забору.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки потрібно зберігати закритими і до 48 годин при температурі від 2 до 8 °С перед тестуванням.

Для довготривалого зберігання зразки потрібно заморозити тільки один раз при температурі -20 °С до тестування. Розморожені зразки потрібно інвертувати кілька разів перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо в початковому аналізі виявлено, що зразок містить більше, ніж найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені *Нульовим Стандартом* і повторно проаналізовані, як описано в процедурі аналізу. Для розрахунку концентрацій цей фактор розведення слід враховувати.

Наприклад:

а) розведення 1:10: 10 мкл зразок + 90 мкл *0 Стандарту* (ретельно перемішати)

б) розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл *0 Стандарту* (ретельно перемішати)

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Основні примітки

- Перед використанням всі реагенти та зразки потрібно довести до кімнатної температури. Всі реагенти потрібно перемішати, не утворилася піна.
- Рекомендується безперервно проводити тестування.

- Використовуйте нові одноразові пластикові наконечники для піпеток для кожного стандарту, контролю або зразка для того, щоб уникнути забруднення.
- Абсорбція – це функція часу інкубації та температури. Перед початком проведення процедури рекомендується підготувати всі реагенти, зняти кришечки, усі необхідні лунки встановити на тримачі та ін. Це забезпечить однаковий час для кожного етапу піпетування без перерви.
- Як правило, ферментна реакція лінійно пропорційна до часу та температури.

6.2 Процедура аналізу

Для кожного аналізу слід будувати стандартну криву.

Всі стандарти, зразки та контролю потрібно аналізувати у двох примірниках. Всі стандарти, зразки та контролю потрібно аналізувати одночасно, щоб умови тестування були однаковими.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у тримачі.
2. Додайте **50 мкл Стандарту, Контролю та зразків новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки.
3. Додайте **100 мкл Ферментного кон'югату** у кожну лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі дуже важливо є добре розмішати.
4. Інкубуйте протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Витрусіть вміст лунок.

Промийте лунки **3 рази** розбавленим *Промивним Розчином* (400 мкл на лунку). Струсіть лунки на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки води.

Примітка: чутливість та точність цього аналізу помітно впливає на правильність виконання процедури промивання!

6. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** у кожну лунку.
7. Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп Розчину** у кожну лунку.
9. Визначіть абсорбцію (ОЩ) лунок при 450 нм (зчитування) та при 620 нм - 630 нм (віднімання фону) мікротитровим планшетним зчитувачем. Рекомендується зчитати лунки протягом **10 хвилин** після додавання *Стоп Розчину*.

6.3 Розрахунок результатів

1. Підрахуйте середнє значення абсорбції для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнта.
2. За допомогою графічного паперу побудуйте стандартну криву використовуючи середню абсорбцію отриману з кожного стандарту до його концентрації зі значенням абсорбції на вертикальній осі (Y) та концентрацією на горизонтальній осі (X).
3. Використовуючи середнє значення абсорбції для кожного зразка визначіть відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичний метод: Результати у Інструкції з використання були розраховані автоматично використовуючи 4-Параметрову криву. (4 Parameter Rodbard або 4 Parameter Marquardt є кращими методами).
5. Концентрацію зразків можна зчитати з цієї стандартної кривої. Зразки із концентраціями вищими ніж найвищий стандарт, потрібно розбавляти або повідомляти як >100 нг/мл. Для розрахунку концентрацій цей фактор розведення потрібно враховувати.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані наведені тільки для демонстрації і **не можуть** використовуватися замість генерації даних під час аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Нульовий стандарт (0 нг/мл)	0.06
Стандарт 1 (5 нг/мл)	0.20
Стандарт 2 (10 нг/мл)	0.34
Стандарт 3 (25 нг/мл)	0.62
Стандарт 4 (50 нг/мл)	1.12
Стандарт 5 (100 нг/мл)	2.04

7.ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Для кожної лабораторії рекомендується встановлювати свої власні нормальні та патологічні значення.

Результати cut-off (5 нг/мл для некурящих і 10 нг/мл для курящих).

Самі результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати повинні корелювати з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Лабораторна практика вимагає, щоб контролю запускали з калібрувальною кривою. Статистично значущу кількість контролів слід оцінювати для встановлення середніх значень і допустимих діапазонів для забезпечення належної продуктивності.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних і федеральних правил. Використання контрольних зразків рекомендується для забезпечення щоденної достовірності результатів. Використовуйте контрольні на нормальному та патологічному рівнях. Контролі та відповідні результати QC-лабораторії вказані в сертифікаті QC, доданому до набору. Значення і діапазони, вказані на аркуші QC, завжди посилаються на поточну партію комплектів і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів. Також, рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості, щоб забезпечити точність результатів. Використовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень і тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим допустимим діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнта повинні вважатися недійсними. У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: пристрої піпетування та синхронізації; фотометр, термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, методи аспірації та промивання. Після перевірки вищезазначених пунктів, не виявивши жодної помилки, зверніться безпосередньо до дистриб'ютора або DRG.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон дослідження 0.596 – 100 нг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Не виявлена.

9.3 Чутливість

Аналітичну чутливість DRG ELISA було обчислено з додаванням 2 стандартних похибок до двадцяти повторних аналізів Нульового Стандарту і була визначена < 0.596 нг/мл.

9.4 Точність

Варіація в середині аналізу – 3.2% - 4.9%.

Варіація між аналізами – 5.6% - 6.3%.

9.5 Відновлення

Зразки підбирали шляхом додавання розчинів PEA з відомими концентраціями у відношенні 1:1. % відновлення був розрахований шляхом множення співвідношення вимірювань та очікуваних результатів на 100 (очікуване значення = (ендогенний PEA + доданий PEA)/2; внаслідок

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (нг/мл)	3.3	18.3	47.1
Середнє відновлення (%)	90.3	89.4	101.1
Діапазон відновлення (%)	від	87.6	85.8
	до	95.6	95.2
			92.5
			107.0

9.6 Лінійність

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація (нг/мл)	17.7	44.6	85.3
Середнє відновлення (%)	109.3	96.7	99.9
Діапазон відновлення (%)	від	105.7	89.9
	до	114.6	100.4
			93.1
			106.3

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкції і з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження з зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Слід уникати гемолітичної, іктеричної та ліпемічної сироватки.

Аналіз містить реагенти, щоб зменшити інтерференцію НАМА та гетерофільних антитіл. Однак, дуже високі титри НАМА або гетерофільних антитіл можуть впливати на результати тесту.

10.2 Вплив препаратів

У курящих спостерігається підвищений рівень PEA (див. «Очікувані значення»).

10.3 «Хук-ефект»

«Хук-ефект» не спостерігався у цьому тесті до 8000 нг/мл PEA.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Випробування необхідно проводити точно згідно з інструкціями виробника. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил

GLP (Good Laboratory Practice) або інших використовуваних національних стандартів та/або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в тестовій процедурі достатню кількість контролів для перевірки точності та достовірності тесту.

Результати випробувань є дійсними лише тоді, коли всі контролі знаходяться в межах вказаних діапазонів і якщо всі інші параметри випробувань також входять до заданих специфікацій аналізу. У разі виникнення будь-яких питань звертайтеся до DRG.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні результати не повинні базуватися тільки на лабораторних даних, навіть коли всі результати тесту відповідають значенням, вказаним у п.11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною клінічної картини пацієнта.

Тільки в тих випадках, коли результати лабораторних досліджень є прийнятними у відповідності з загальною клінічною картиною пацієнта, слід вивести терапевтичні наслідки.

Сам результат тестування ніколи не повинен бути єдиним визначальним чинником для отримання будь-яких терапевтичних наслідків.

11.3 Відповідальність

Будь-яка модифікація тестового набору і/або заміна або перемішування компонентів з різних лотів з одного тестового набору до іншого можуть негативно вплинути на результати тесту. Такі дії не дають можливості вимагати заміну.

Претензії, подані внаслідок неправильного тлумачення результатів лабораторних досліджень з боку замовника відповідно до пункту 11.2, також є недійсними. Незважаючи на це, у разі будь-якої претензії, відповідальність виробника не повинна перевищувати значення тестового набору. Будь-які пошкодження, нанесені тестовому набору під час транспортування, не підлягають під відповідальність виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
 вул. Фраунберг 18, 35039
 м. Марбург, Німеччина
 Тел: +49(0)64 21/170 00
 Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
 e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
 вул. Симона Петлюри, 25
 м. Івано-Франківськ, 76014
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

