

PATHOZYME® CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN Ref OD317

Immunoenzymatyczny test (EIA) do ilościowego oznaczania CEA w ludzkiej surowicy. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Antygen rakowo-embryonalny jest antygenem rakowo-embryonalnym. CEA jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 200 000 Da. Podwyższony poziom CEA w surowicy występuje w powiązaniu z wieloma nowotworami, w tym: płuc, wątroby, trzustki, piersi, okrężnicy, gruczołu krokowego, żołądka i jajników. W wielu z tych przypadków zalecane jest aby oznaczenie CEA w surowicy przeprowadzić w połączeniu z innymi, bardziej tradycyjnymi markerami nowotworowymi.

Podwyższony poziom CEA w surowicy występuje u 80% chorych z nowotworem okrężnicy. Jednakże wynik testu musi być zinterpretowany w połączeniu ze wszystkimi, klinicznymi objawami, ponieważ niektóre, łagodne zmiany, takie jak choroby wątroby, mogą również powodować nieznaczne podwyższenie CEA. Podwyższony poziom CEA występuje u 67% przypadków z rozległymi nowotworami płuc i u 33% przypadków z niewielkimi zmianami nowotworowymi.

W nowotworach złośliwych poziom CEA w surowicy jest ściśle powiązany ze stadiem i rozległością zmian miejsc zajętych chorobowo. Dlatego CEA jest bardzo przydatne w monitorowaniu zastosowanego leczenia u pacjentów z nowotworami. Z ostatnich doniesień wynika, że CEA jest najlepszym nieinwazyjnym narzędziem do monitorowania pacjentów z nowotworami okrężnicy. Przedoperacyjny poziom CEA jest również dobrym prognostykiem w przypadku nowotworów piersi i okrężnicy. Wysoki poziom CEA przed operacją jest złą zapowiedzią odnośnie szans wyleczenia.

PRZEZNACZENIE

PATHOZYME CEA jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania antygenu rakowo-embryonalnego (CEA) w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

ZASADA

Kubeczki mikroptyki opłaszczane są specyficznymi, monoklonalnymi przeciwciałami anti-CEA. Do testu należy użyć surowicy. Następnie dodawane są monoklonalne przeciwciała anti-CEA znakowane peroksydazą chranową (koniuugat enzymatyczny). CEA obecne w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniuugat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniugatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniuugat enzymatyczny, wskazujący na obecność CEA w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Stężenie CEA jest wprost proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia.

Test został wykalibrowany względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU

Ref
OD317



Microtitre Plate		12 x 8 wells x 1
Dzielona mikroptyka z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.		
Cal	A	0 ng/ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona CEA. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Cal	B	3 ng/ml
Standard referencyjny: CEA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Cal	C	12 ng/ml
Standard referencyjny: CEA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Cal	D	30 ng/ml
Standard referencyjny: CEA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Cal	E	60 ng/ml
Standard referencyjny: CEA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Cal	F	120 ng/ml
Standard referencyjny: CEA rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Conj		11ml
Anti-CEA HRP Koniugat: koniuugat anti-CEA znakowany HRP. Gotowy do użycia. (Różowy)		
Subs	TMB	11ml
Roztwór Substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Soln	Stop	HCl
		1M
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Instrukcja i druk protokołu.		
		1 +1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl, 1000µl i 5000µl.
Końcówki do pipet.
Papier absorbujący.
Czytnik mikroptyłek z filtrem 450 nm.
Papier milimetrowy.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME CEA zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV 1 i 2 – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME CEA nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME CEA zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME CEA zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżą surowicę.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydku sodowego jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplatyki. Zannotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl anty-CEA koniugatu.
6. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
7. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkażający.
9. Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytłuszczyć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
10. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
11. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkażający. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzanie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
12. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
13. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
14. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
15. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
16. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplatek przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplatyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikroplatyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odzwierciedlenia wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{550}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości CEA dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Kompleksowe badania wraz z oznaczeniem poziomu CEA, przeprowadzono na 35,000 próbek pobranych od ponad 10,000 pacjentów i grupy kontrolnej. Przebadano 1425 zdrowych osób niepalących, u 98,7% poziom CEA był niższy niż 5,0 ng/ml. Zalecane jest aby każde laboratorium opracowało własne zakresy wartości prawidłowych. Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME CEA** stężenie CEA wynosi 1,0 ng/ml.

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME CEA** jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyme CEA kit i Abbott AxSym CEA kit użyto próbek o wartościach CEA pomiędzy 0,2 a 50 400 ng/ml.

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENICTWO

- (1) **Gold, P., Freedman, S. O.** Demonstration of tumour specific antigen in human colonic carcinoma by immunologic tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 1965;127:439-462.
- (2) **Thompson, D. P. M., Krupcy, J., Freedman, S. O. et al.** The radioimmunoassay of circulating Carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1969;64:161-167.
- (3) **Schwartz, M. K.** Tumour Markers in diagnosis and screening. In Ting, S. W., Chen, J. S., Schwartz, M. K. (eds.). *Human Tumour Markers*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987;3-16.
- (4) **Zamcheck, N. and Martin, E. W.** Sequential Carcinoembryonic Antigen levels in Pancreatic Cancer: Some Clinical Correlations. *Cancer*, 1981;47:1620-1627.
- (5) **Mughal, A. W., Hortobagyi, G. N., Fritsche, H. A., Buzdar, A. U., Yap, H-Y. and Blumenschein, G. R.** Serial Plasma Carcinoembryonic Antigen Measurements During Treatment of Metastatic Breast Cancer. *JAMA*. 1983;259:1881-1886.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów lub próbek badanych, a następnie dodać do każdego kubeczka po 100µl koniugatu anty-CEA i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
2. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
3. Wylać zawartość z kubeczków i przemyc 5-krotnie wodą destylowaną.
4. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
5. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
6. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
7. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8081 ISSUE 5 Revised July 2010
©Omega Diagnostics Ltd 2010. **POLISH**



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY