



CanAg CEA EIA

REF 401-10

Οδηγίες χρήσης
2009-11

Κιτ δοκιμής ενζυματικής ανοσομέτρησης
για 96 προσδιορισμούς

ΣΚΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Το κιτ CanAg CEA EIA προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του καρκινικού αντιγόνου CEA στον ορό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς που έπασχαν από καρκίνωμα του παχέος εντέρου και σε επιθηλιακούς όγκους ενδοδερμικής προέλευσης (γαστρεντερική οδός) από τους Gold και Freedman (1). Το μόριο CEA είναι εξαιρετικά ετερογενές εξαιτίας του περιεχομένου σε υδατάνθρακες (50-60%) και ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία κάθαρσης. Είναι διαλυτό σε υπερχλωρικό οξύ και έχει μοριακό βάρος περίπου 175.000–200.000 Dalton (2). Ο ανοσολογικός και γεννητικός χαρακτηρισμός του CEA προσδιόρισε μια οικογένεια μορίων τύπου CEA με κοινούς αντιγονικούς προσδιοριστές. Τα πιο σχετικό μόριο τύπου CEA είναι το NCA (μη ειδικό διασταυρούμενης αντίδρασης επιφανειακό αντιγόνο) που συντίθεται σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς. Το πρόβλημα των μορίων τύπου CEA διασταυρούμενης αντίδρασης κατά τη δοκιμή για CEA μπορεί να υπερκεραστεί με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η CanAg CEA EIA βασίζεται σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι των επίτοπων Gold IV και V (3, 4).

Το CEA εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα και αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενο ορολογικό δείκτη των καρκινωμάτων του γαστρεντερικού, του καρκίνου των πνευμόνων και του καρκίνου του μαστού. Σε ορθοκολικό καρκίνο, η κλινική χρήση της εξέτασης CEA για παρακολούθηση της απόκρισης σε θεραπεία και για την τεκμηρίωση προοδευτικής νόσου είναι καλά εμπεριστατωμένη (5, 6). Το CEA μπορεί να υπάρχει επίσης σε καλοήγη φλεγμονώδη νοσήματα του γαστρεντερικού ή σε ηπατοχολικά νοσήματα. Αυτές οι παρατηρήσεις καθιστούν απαραίτητο να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι η δοκιμή CEA δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως εξέταση για καρκίνο.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η CanAg CEA EIA είναι μια ανοσολογική μη-ανταγωνιστική δοκιμή στέρεας φάσης, η οποία βασίζεται στην άμεση τεχνική τύπου σάντουιτς. Οι βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα ασθενούς επωάζονται μαζί με βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CEA και σύζευγμα μονοκλωνικού αντισώματος anti-CEA και υπεροξειδάσης από ραφανίδα (HRP-labelled) σε βοθρία με επικάλυψη στρεπταβιδίνης. Μετά την πλύση, το ρυθμιστικό αντιδραστήριο υποστρώματος/χρωμογόνου (υπεροξειδίου του υδρογόνου και 3, 3', 5, 5' τετραμεθυλοβενζιδίνη) προστίθεται σε κάθε βοθρία και επιτρέπει να προχωρήσει η αντίδραση ενζύμου. Κατά την αντίδραση ενζύμου, εμφανίζεται μπλε χρώμα παρουσία αντιγόνου. Η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη προς την ποσότητα CEA στα δείγματα.

Η ένταση του χρώματος προσδιορίζεται σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών σε μήκος κύματος 620 nm (ή προαιρετικά σε μήκος κύματος 405 nm μετά την προσθήκη διαλύματος τερματισμού). Οι καμπύλες βαθμονόμησης δημιουργούνται για κάθε δοκιμή με τη γραφική αναπαράσταση των τιμών απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης για κάθε βαθμονομητή. Οι συγκεντρώσεις του CEA στα δείγματα ασθενούς λαμβάνονται από την καμπύλη βαθμονόμησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Κάθε kit CanAg CEA EIA περιέχει αντιδραστήρια για 96 δοκιμές.
- Η ημερομηνία λήξης του kit αναγράφεται στην ετικέτα, στο εξωτερικό της συσκευασίας του kit.
- Μην χρησιμοποιήσετε το kit μετά την ημερομηνία λήξης.
- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες kit.
- Αποθηκεύστε τα kit σε θερμοκρασία 2–8°C. Μην καταψύχετε.
- Τα ανοιγμένα αντιδραστήρια είναι σταθερά σύμφωνα με τον πίνακα παρακάτω, με την προϋπόθεση ότι δεν έχουν μολυνθεί, αποθηκευθεί σε επανασφραγισμένα αρχικά δοχεία και ότι ο χειρισμός γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες. Πρέπει να γίνει επαναφορά σε θερμοκρασία 2-8°C αμέσως μετά τη χρήση.

Συστατικό	Ποσότητα	Αποθήκευση και σταθερότητα μετά το πρώτο άνοιγμα
-----------	----------	--

MICROPLA

Μικροπλάκα	1 πλάκα	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην πλάκα
-------------------	---------	---

12 x 8 βοθρία με επικάλυψη στρεπταβιδίνης. Μετά το άνοιγμα, επιστρέψτε αμέσως τα αχρησιμοποίητα βοθρία στο αλουμινένιο δοχείο που περιέχει αφυγραντικό. Σφραγίστε ξανά προσεχτικά για να διατηρηθούν στεγνά

Βαθμονομητές CEA	6 φιαλίδια	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στα φιαλίδια
-------------------------	------------	---

CAL	CEA	0	0 µg/L	1 x 8 mL
CAL	CEA	2	2 µg/L	1 x 0,75 mL
CAL	CEA	5	5 µg/L	1 x 0,75 mL
CAL	CEA	15	15 µg/L	1 x 0,75 mL
CAL	CEA	50	50 µg/L	1 x 0,75 mL
CAL	CEA	75	75 µg/L	1 x 0,75 mL

Ανθρώπινο CEA σε αλατούχο ρυθμισμένο με Tris-HCl που περιέχει λευκωματίνη βόειου ορού, αδρανή κίτρινη βαφή και 0,01% μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Έτοιμο για χρήση. Θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιηθεί

CAL	CEA	0
-----	-----	---

 για την αραιώση των δειγμάτων.

Συστατικό	Ποσότητα	Αποθήκευση και σταθερότητα μετά το πρώτο άνοιγμα
Υλικά ελέγχου CEA	2 φιαλίδια	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στα φιαλίδια
CONTROL CEA 1	1 x 0,75 mL	
CONTROL CEA 2	1 x 0,75 mL	

Ανθρώπινη CEA σε αλατούχο ρυθμισμένο με Tris-HCl που περιέχει λευκωματίνη βόειου ορού και 0,01% μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Έτοιμο για χρήση.

BIOTIN	Anti-CEA
---------------	-----------------

Anti-CEA βιοτίνης	1 x 15 mL	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο
--------------------------	-----------	---

Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CEA βιοτίνης από ποντίκι, περίπου 3 µg/mL. Περιέχει φυσιολογικό ορό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (pH 7,2), λευκωματίνη βόειου ορού, βόεια ανοσοσφαιρίνη, ανασταλτικούς παράγοντες, Tween 20, αδρανή μπλε βαφή και 0,01% μεθυλ-ισοθειαζολόνη (MIT) ως συντηρητικό. Να αναμιχθεί με ιχνηθέτη HRP anti-CEA πριν από τη χρήση.

CONJ	Anti-CEA
-------------	-----------------

Ιχνηθέτης, HRP anti-CEA	1 x 0,75 mL	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο
--------------------------------	-------------	---

Μητρικό διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος HRP anti-CEA από ποντίκι, κατά προσέγγιση 60 µg/mL. Περιέχει συντηρητικά. Να αναμιχθεί με το anti-CEA βιοτίνης πριν από τη χρήση.

SUBS	TMB
-------------	------------

TMB υποστρώματος HRP	1 x 12 mL	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο
-----------------------------	-----------	---

Περιέχει ρυθμιστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου και 3, 3', 5, 5' τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB). Έτοιμο για χρήση.

Συστατικό	Ποσότητα	Αποθήκευση και σταθερότητα μετά το πρώτο άνοιγμα
-----------	----------	--

STOP

Διάλυμα τερματισμού	1 x 15 mL	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο
---------------------	-----------	---

Περιέχει 0,12 M υδροχλωρικού οξέος. Έτοιμο για χρήση.

WASHBUF 25X

Συμπύκνωμα πλύσης	1 x 50 mL	2—8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στη φιάλη
-------------------	-----------	--

Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα με Tris-HCl με Tween 20. Περιέχει Germall II ως συντηρητικό. Να αραιωθεί με νερό 25 φορές πριν από τη χρήση.

Ενδείξεις αστάθειας

Το TMB υποστρώματος HRP θα πρέπει να είναι άχρωμο ή ελαφρώς κυανόχρουν. Το μπλε χρώμα δηλώνει ότι το αντιδραστήριο έχει μολυνθεί και θα πρέπει να απορριφθεί.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

- Για επαγγελματική χρήση μόνο.
- Ανατρέξτε στη δημοσίευση αρ. (CDC) 88-8395 του Υπουργείου Υγείας και Ανθρώπινων Υπηρεσιών των ΗΠΑ (Bethesda, Md., US) σχετικά με την ασφάλεια στο εργαστήριο και άλλους τοπικούς ή εθνικούς κανονισμούς.
- Χειριστείτε όλα τα δείγματα ασθενούς σαν να ήταν εν δυνάμει μολυσματικά.
- Ακολουθήστε τις τοπικές κατευθυντήριες οδηγίες για την απόρριψη των αποβλήτων.

Προσοχή

Το υλικό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή αντιδραστηρίου ανθρώπινης προέλευσης έχει δοκιμαστεί και βρέθηκε ότι δεν αντιδρά για το αντίσωμα έναντι του HIV-1/2, το αντίσωμα έναντι της Ηπατίτιδας C (HCV) και το αντιγόνο επιφανείας Ηπατίτιδας Β (HBsAg). Καθώς καμία μέθοδος δεν μπορεί να αποκλείσει εντελώς την παρουσία αιματογενώς μεταδιδόμενων νοσημάτων, ο χειρισμός και η απόρριψη των αντιδραστηρίων ανθρώπινης προέλευσης από αυτό το προϊόν θα πρέπει να γίνεται σαν να ήταν εν δυνάμει μολυσματικά.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το CanAg CEA EIA προορίζεται για χρήση με τον ορό. Συλλέξτε το αίμα με φλεβοκέντηση και διαχωρίστε τον ορό ακολουθώντας τις τυπικές διαδικασίες. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευθούν στους 2–8° C για 2 ημέρες. Για μεγαλύτερες περιόδους, συνιστάται η αποθήκευση των δειγμάτων σε θερμοκρασία –20° C ή μικρότερη. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων. Η απόψυξη των κατεψυγμένων δειγμάτων πρέπει να γίνεται αργά, κατά προτίμηση στους 2–8° C κατά τη διάρκεια της νύχτας και, στη συνέχεια, τα δείγματα πρέπει να αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου πριν από την ανάλυση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Υλικά που απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται στο kit

1. Αναδευτήρας μικροπλακών

Η ένταση της ανάδευσης πρέπει να είναι μέτρια έως δυνατή. Κατά μήκος ανάδευση με 200 διαδρομές/min, ταλαντώσεις 700-900/min κατά προσέγγιση.

2. Συσσκευή πλήσης μικροπλάκας

Αυτόματη συσκευή πλήσης πλάκας που εκτελεί 1 και 6 κύκλους πλήσης με ελάχιστο όγκο πλήρωσης 350 μL/βοθρίο/κύκλο πλήσης.

Συνιστάται το μη αυτόματο πλυτικό βοθρίων Nunc Immuno-8 αν δεν χρησιμοποιείται αυτόματη συσκευή πλήσης μικροπλάκας.

3. Φασματοφωτόμετρο μικροπλακών

Με μήκος κύματος 620 nm ή/και 405 nm και περιοχή απορρόφησης 0 έως 3,0.

4. Πιπέτες ακριβείας

Με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη για την παροχή όγκων σε μικρολίτρα και χιλιοστόλιτρα.

Είναι χρήσιμη, αλλά όχι απαραίτητη, πιπέτα 8 καναλιών ή πιπέτα διανομής με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη για την παροχή 100 μL.

5. Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Για προετοιμασία του διαλύματος πλήσης.

Σημειώσεις διαδικασίας

1. Απαιτείται πλήρης κατανόηση του ένθετου σε αυτό το πακέτο για να διασφαλιστεί η σωστή χρήση του kit CanAg CEA EIA. Τα αντιδραστήρια που παρέχονται με το kit, προορίζονται για χρήση ως ενιαία μονάδα. Μην αναμειγνύετε πανομοιότυπα αντιδραστήρια από kit με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια kit μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο εξωτερικό της συσκευασίας του kit.
2. Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου (20–25°C) πριν από τη χρήση. Η δοκιμή θα πρέπει να διεξαχθεί μόνο σε θερμοκρασίες μεταξύ 20–25°C για την απόκτηση αποτελεσμάτων ακριβείας. Τα κατεψυγμένα δείγματα θα πρέπει να αποκτήσουν τη θερμοκρασία δωματίου αργά και να αναμειχθούν με απαλές κινήσεις μετά την απόψυξη.
3. Πριν ξεκινήσετε τη χορήγηση βαθμονομητών, υλικών ελέγχου και δειγμάτων ασθενούς με πιπέτα, συνιστάται να σημειώσετε τα βοηθία ώστε να μπορέσετε να αναγνωρίσετε τα δείγματα πριν και μετά τη δοκιμή.
4. Η απαίτηση για επιμελή και διεξοδική πλύση για διαχωρισμό του δεσμευμένου και μη δεσμευμένου αντιγόνου και των αντιδραστηρίων από τα συμπλέγματα δεσμευμένων αντισωμάτων-αντιγόνων στέρεας φάσης είναι ένα από τα σημαντικότερα βήματα σε μια EIA. Για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική πλύση, βεβαιωθείτε ότι όλα τα βοηθία πληρούνται πλήρως με διάλυμα πλύσης κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου πλύσης, ότι το διάλυμα πλύσης παρέχεται με καλή ροή, ότι η αναρρόφηση των βοηθίων μεταξύ και μετά τους κύκλους πλύσης είναι πλήρης και ότι τα βοηθία είναι κενά. Αν έχει απομείνει υγρό, αναστρέψτε την πλάκα και χτυπήστε την προσεχτικά πάνω σε απορροφητικό χαρτί.
 - Αυτόματο πλυτικό βοηθίων: Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για τον ενδεδειγμένο καθαρισμό και τη συντήρηση. Πλύντε με τον απαραίτητο αριθμό κύκλων πλύσης πριν και μετά από κάθε βήμα επώασης. Συνιστάται η χρήση του τρόπου επεξεργασίας ανά stir και του τρόπου πλύσης με *υπερχείλιση* με παροχή όγκου 800 μL. Η συσκευή αναρρόφησης/πλύσης δεν πρέπει να παραμένει με το διάλυμα πλύσης για μεγάλες περιόδους, καθώς οι βελόνες μπορεί να φράξουν, με αποτέλεσμα ανεπαρκή παροχή και αναρρόφηση υγρού.
5. Το TMB υποστρώματος HRP είναι πολύ ευαίσθητο σε μόλυνση. Για βέλτιστη σταθερότητα του TMB υποστρώματος HRP, χύστε την απαραίτητη ποσότητα από το φιαλίδιο σε διεξοδικά καθαρισμένο δοχείο ή κατά προτίμηση σε αναλώσιμο πλαστικό δίσκο, για αποφυγή μόλυνσης του αντιδραστηρίου. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη πιπέτων (ή ρύγχος πιπέτας διανομής).
6. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε καθαρά αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη πιπέτας και κατάλληλη τεχνική για παροχή με πιπέτα κατά το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων. Αποφύγετε τη μεταφορά υλικού κρατώντας το ρύγχος της πιπέτας ελαφρώς πάνω από την κορυφή του βοηθίου και αποφύγετε να αγγίξετε το πλαστικό βοηθίο ή την επιφάνεια του υγρού. Η κατάλληλη τεχνική παροχής με πιπέτα είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά το χειρισμό του διαλύματος TMB υποστρώματος HRP.

Παρασκευή αντιδραστηρίων	Σταθερότητα του παρασκευασμένου αντιδραστηρίου
---------------------------------	---

Διάλυμα πλύσης

2 εβδομάδες στους 2–25°C σε σφραγισμένο δοχείο

Χύστε το συμπύκνωμα πλύσης 50 mL σε καθαρό δοχείο και αραιώστε 25 φορές με την προσθήκη 1200 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.

Διάλυμα αντισώματος

3 εβδομάδες στους 2–8°C

Προετοιμάστε την απαραίτητη ποσότητα διαλύματος αντισώματος αναμειγνύοντας 50 μL ιχνηθέτη, HRP anti-CEA με 1 mL anti-CEA βιοτίνης ανά strip (δείτε τον πίνακα παρακάτω και το φύλλο πρωτοκόλλου).

Αρ. βιοθρίων	Ιχνηθέτης, HRP anti-CEA (μL)	Anti-CEA βιοτίνης (mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί καθαρή πλαστική ή γυάλινη φιάλη για την παρασκευή του διαλύματος αντισώματος.

Εναλλακτική: Χύστε το περιεχόμενο του ιχνηθέτη, HRP anti-CEA στο φιαλίδιο του anti-CEA βιοτίνης και αναμείξτε απαλά. Βεβαιωθείτε ότι όλος ο ιχνηθέτης, HRP anti-CEA μεταφέρεται στο φιαλίδιο του αντισώματος anti-CEA βιοτίνης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το διάλυμα αντισώματος είναι σταθερό για 3 εβδομάδες στους 2–8°C. Μην παρασκευάσετε περισσότερο διάλυμα αντισώματος από την ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί εντός αυτής της περιόδου και βεβαιωθείτε ότι έχει αποθηκευθεί σωστά.

Διαδικασία δοκιμής

Πραγματοποιήστε κάθε προσδιορισμό δύο φορές για βαθμονομητές, υλικά ελέγχου και δείγματα ασθενούς. Η καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει να εκτελείται με κάθε δοκιμή. Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να αποκτούν τη θερμοκρασία δωματίου (20–25°C) πριν από τη χρήση.

- Ξεκινήστε με την παρασκευή του διαλύματος πλύσης και του διαλύματος αντισώματος. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία. Ακολουθήστε τις οδηγίες με προσοχή.
- Μεταφέρετε τον απαιτούμενο αριθμό βοθρίων μικροπλάκας σε ένα πλαίσιο βοθρίων. (Τοποθετήστε αμέσως τα υπόλοιπα βοθρία στο αλουμινένιο δοχείο που περιέχει αφυγραντικό και σφραγίστε ξανά με προσοχή). Πλύντε κάθε βοθρίο μία φορά με το διάλυμα πλύσης. Μην πλύνετε περισσότερα βοθρία από όσο είναι δυνατόν σε 30 λεπτά.
- Χορηγήστε με πιπέτα 25 μL των βαθμονομητών CEA (CAL 0, 2, 5, 15, 50, 75), των υλικών ελέγχου (C) και των δειγμάτων ασθενούς (άγνωστα-Unk) στα βοθρία σύμφωνα με το παρακάτω σχέδιο:

	1	2	3	4	5	6	7 κ.λπ.
A	Cal 0	Cal 50	Unk 1				
B	Cal 0	Cal 50	Unk 1				
C	Cal 2	Cal 75	Unk 2				
D	Cal 2	Cal 75	Unk 2				
E	Cal 5	C1	κ.λπ.				
F	Cal 5	C1					
G	Cal 15	C2					
H	Cal 15	C2					

- Προσθέστε 100 μL διαλύματος αντισώματος σε κάθε βοθρίο με τη χρήση πιπέτας ακριβείας 100 μL (ή πιπέτας ακριβείας 100 μL με 8 κανάλια). Αποφύγετε τη μεταφορά υλικού κρατώντας το ρύγχος της πιπέτας ελαφρώς πάνω από την κορυφή του βοθρίου και αποφύγετε να αγγίξετε τα πλαστικά βοθρία ή την επιφάνεια του υγρού.
- Επώαστε το πλαίσιο που περιέχει τα βοθρία για 1 ώρα (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου (20–25°C) με διαρκή ανάδευση της πλάκας χρησιμοποιώντας αναδευτήρα μικροπλάκας.
- Πλύντε κάθε βοθρίο 6 φορές χρησιμοποιώντας τη διαδικασία πλύσης που περιγράφεται στις σημειώσεις διαδικασίας, σημείο 4.
- Προσθέστε 100 μL TMB υποστρώματος HRP σε κάθε βοθρίο με τη χρήση της ίδιας διαδικασίας χορήγησης με πιπέτα όπως και στο σημείο 4. Το TMB υποστρώματος HRP θα πρέπει να προστεθεί στα βοθρία όσο το δυνατόν πιο γρήγορα και ο χρόνος μεταξύ της προσθήκης του πρώτου και του τελευταίου βοθρίου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5 λεπτά.
- Επώαστε για 30 λεπτά (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου με διαρκή ανάδευση. Αποφύγετε το άμεσο ηλιακό φως.

Φύλλο πρωτοκόλλου

CanAg CEA EIA REF **401-10**

Αναμίξτε τα συστατικά ακριβώς πριν από τη χρήση. Χρησιμοποιήστε τις συνθήκες ανάδειξης σύμφωνα με τις οδηγίες.

Βήμα	Φιάλη/πλάκα	Διαδικασία
1. Παρασκευή διαλύματος πλύσης	WASHBUF 25X	Αραιώστε 50 mL συμπυκνώματος πλύσης με 1200 mL απεσταγμένου ή αποιονισμένου νερού.
Παρασκευή διαλύματος αντι σώματος	CONJ Anti-CEA	Αναμίξτε 50 µL ιχνηθέτη HRP anti-CEA με 1 mL anti-CEA βιοτίνης ανά βιοθρίο:
	BIOTIN Anti-CEA	
		Αρ. Ιχνηθέτης HRP anti-CEA (µL) Anti-CEA βιοτίνης (mL)
		1 50 1
		2 100 2
		3 150 3
		4 200 4
		5 250 5
		6 300 6
		7 350 7
		8 400 8
		9 450 9
		10 500 10
		11 550 11

					12	600	12	12
2.	Πλύση	MICROPLA	Πλύντε κάθε βοθρίο μία φορά με διάλυμα πλύσης					
3.	Προσθήκη βαθμονομημένων, υλικών ελέγχου και δειγμάτων	CAL CEA 0, 2, 5, 15, 50, 75 CONTROL CEA	25 µL σε κάθε βοθρίο					
		1,2						
4.	Προσθήκη διαλύματος αντισώματος	ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ	100 µL σε κάθε βοθρίο					
5.	Επίωση	MICROPLA	1 ώρα ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου					
6.	Πλύση	MICROPLA	Πλύντε κάθε βοθρίο έξι φορές με διάλυμα πλύσης					
7.	Προσθήκη TMB υποστρώματος HRP	SUBS TMB	100 µL σε κάθε βοθρίο					
8.	Επίωση	MICROPLA	30 λεπτά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου					
9.	Μέτρηση απορρόφησης	MICROPLA	620 nm					
Alt.9	Προσθήκη διαλύματος τερματισμού	STOP	100 µL σε κάθε βοθρίο					
Alt.10	Επίωση	MICROPLA	1 λεπτό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου					
Alt.11	Μέτρηση απορρόφησης	MICROPLA	Μέτρηση σε μήκος κύματος 405 nm εντός 15 λεπτών					

9. Καταγράψτε αμέσως την απορρόφηση σε μήκος κύματος 620 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών.

Προαιρετικά

Αν το εργαστήριο δεν έχει πρόσβαση σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών που να είναι ικανό για μετρήσεις σε μήκος κύματος 620 nm, η απορρόφηση μπορεί να καθοριστεί ως εξής:

- Alt. 9. Προσθέστε 100 μL διαλύματος τερματισμού. Αναμείξτε και μετρήστε την απορρόφηση σε μήκος κύματος 405 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών εντός 15 λεπτών από την προσθήκη διαλύματος τερματισμού.

Περιοχή τιμών μέτρησης

Το CanAg CEA EIA μετράει συγκεντρώσεις μεταξύ 0,25 και 75 μg/L. Αναμένονται συγκεντρώσεις CEA πάνω από την περιοχή τιμών μέτρησης, συνιστάται η αραιώση των δειγμάτων βαθμονομητή CEA 0 πριν από την ανάλυση.

Έλεγχος ποιότητας

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υλικό ελέγχου CEA 1 και 2 για την επικύρωση της σειράς δοκιμών. Οι περιοχές των αναμενόμενων αποτελεσμάτων αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Αν ληφθούν τιμές εκτός της καθορισμένης περιοχής, πρέπει να γίνει πλήρης έλεγχος των αντιδραστηρίων και της απόδοσης της συσκευής μέτρησης, και η ανάλυση θα πρέπει να επαναληφθεί. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να παρασκευάζει επιπρόσθετα τις δικές του ποσότητες ορού σε διαφορετικά επίπεδα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά υλικά ελέγχου για να διασφαλιστεί η ακρίβεια της δοκιμής.

Υλικό αναφοράς

Το 1^ο διεθνές πρότυπο αναφοράς παρασκευής IRP 73/601 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο αναφοράς. Οι τιμές για βαθμονομητές CEA και υλικά ελέγχου αντιστοιχίστηκαν έναντι ενός συνόλου εσωτερικών προτύπων αναφοράς των οποίων οι τιμές ιχνηλατούνται στο IRP 73/601 με χρήση συντελεστή μετατροπής 13,5, δηλαδή 1 μg/L αντιστοιχεί σε 13,5 IU/L.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αν χρησιμοποιείται μετρητής φασματοφωτόμετρου μικροπλακών με ενσωματωμένο πρόγραμμα υπολογισμού δεδομένων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο για το μετρητή πλάκας και δημιουργήστε ένα πρόγραμμα με τη χρήση της συγκέντρωσης που αναφέρεται στις ετικέτες για κάθε βαθμονομητή CEA.

Για τον αυτόματο υπολογισμό των αποτελεσμάτων CEA συνιστάται να χρησιμοποιήσετε κάποια από τις παρακάτω μεθόδους:

- Μέθοδος τριτοβάθμιας πολυωνυμικής καμπύλης. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην καμπύλη με την τιμή 0 μg/L.
- Μέθοδος ομαλοποιημένης πολυωνυμικής καμπύλης. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό.
- Προεκβολή με εκτίμηση σημείου-σε σημείο. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην καμπύλη με την τιμή 0 μg/L.
- Μέθοδος δευτεροβάθμιας πολυωνυμικής καμπύλης. Ο βαθμονομητής 0 θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην καμπύλη με την τιμή 0 μg/L.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί η παραμετρική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων ή η γραμμική παλινδρόμηση.

Για μη αυτόματη εκτίμηση, δημιουργείται μια καμπύλη βαθμονόμησης με τη γραφική αναπαράσταση των τιμών απορρόφησης (A) που λαμβάνονται για κάθε βαθμονομητή CEA έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης CEA (σε μg/L), δείτε την εικόνα παρακάτω. Οι τιμές για τις άγνωστες συγκεντρώσεις CEA λαμβάνονται από την καμπύλη βαθμονόμησης με τη χρήση της τιμής μέσης απορρόφησης για κάθε δείγμα ασθενούς.

Αν τα δείγματα σε μια αρχική ανάλυση δώσουν επίπεδα CEA υψηλότερα από 75 μg/L, πρέπει να αραιωθούν σε 1/10 και 1/100 με βαθμονομητή CEA 0 και να αναλυθούν εκ νέου για τη λήψη της ακριβούς συγκέντρωσης CEA.

1:10 αραιώση = 50 μL δείγματος + 450 μL CEA 0 μg/L

1:100 αραιώση = 50 μL αραιώσης 1:10 + 450 μL CEA 0 μg/L

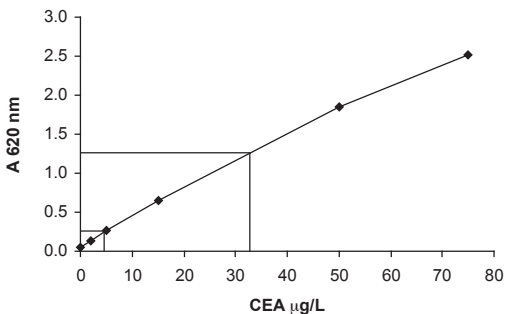
Η συγκέντρωση CEA του μη αραιωμένου δείγματος λαμβάνεται ως εξής:

Αραιώση 1/10: 10 x μετρημένη τιμή

Αραιώση 1/100: 100 x μετρημένη τιμή

Παράδειγμα αποτελεσμάτων

Δείγμα			Τιμές βαθμονομητή	Μέση τιμή απορρόφησης (A)	CEA (μg/L)
CAL	CEA	0	0 μg/L	0,050	
CAL	CEA	2	2 μg/L	0,131	
CAL	CEA	5	5 μg/L	0,259	
CAL	CEA	15	15 μg/L	0,657	
CAL	CEA	50	50 μg/L	1,857	
CAL	CEA	50	50 μg/L	1,857	
CAL	CEA	75	75 μg/L	2,519	
Δείγμα A				0,220	4,1
Δείγμα B				1,290	32,3



Παράδειγμα
(να μην χρησιμοποιηθεί αυτή η καμπύλη ή ο πίνακας
παραπάνω για τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων δοκιμής)

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το επίπεδο του CEA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απόλυτη ένδειξη της παρουσίας ή απουσίας κακοήθους νοσήματος και η εξέταση CEA δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται στον έλεγχο για καρκίνο. Τα αποτελέσματα της εξέτασης θα πρέπει να ερμηνευθούν μόνο σε συνδυασμό με άλλες διερευνήσεις και διαδικασίες για τη διάγνωση της νόσου και τη διαχείριση των ασθενών, και η εξέταση CEA δεν θα πρέπει να αντικαταστήσει την καθιερωμένη κλινική εξέταση.

Τα αντι-αντιδραστικά αντισώματα (ανθρώπινα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών από ποντίκι (HAMA) ή ετεροφιλικά αντισώματα) στο δείγμα ασθενούς μπορεί περιστασιακά να παρέμβουν στη δοκιμή, ακόμα και αν έχουν συμπεριληφθεί συγκεκριμένοι ανασταλτικοί παράγοντες στο ρυθμιστικό διάλυμα.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Το CanAg CEA μετρήθηκε σε 95 υγιείς αιμοδότες και σε 117 υγιή άτομα ηλικίας μεταξύ 60 και 64 ετών. Οι άνω και κάτω τιμές της φυσιολογικής περιοχής τιμών εξετάστηκαν με τη χρήση της μη παραμετρικής στατιστικής μεθόδου που προτείνει η IFCC. Το διάστημα αναφοράς περιέχει το κεντρικό κλάσμα 95% της διανομής αναφοράς. Τα όρια αναφοράς μπορεί να εκτιμηθούν αντιστοίχως ως τα 2,5% (κάτω) και 97,5% (άνω) ποσοστιαία σημεία. Αυτά τα όρια αποκλείουν ένα κλάσμα 2,5% των τιμών σε κάθε ουρά της διανομής αναφοράς. Μη παραμετρικές εκτιμήσεις:

	Μέση τιμή (μg/L)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμή (μg/L)	Περιοχή τιμών (μg/L)	Άνω όριο αναφοράς (Κεντρικό κλάσμα 95%)
Υγιείς αιμοδότες n=95	1,3	1,0	1,0	0,5–9,1	3,2 μg/L
Υγιή άτομα ηλικία 60–64, n=117	2,4	1,7	1,9	0,5–8,8	7,4 μg/L

Το 96% των υγιών ατόμων είχαν τιμές δοκιμής κάτω από 5 μg/L.

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τη δική του περιοχή φυσιολογικών τιμών για παράγοντες του τοπικού περιβάλλοντος, όπως διατροφή, κλίμα, συνθήκες διαβίωσης, επιλογή ασθενούς κ.λπ. Θα πρέπει επίσης να έχετε υπόψη ότι τα αποτελέσματα γραμμής βάσης του ασθενούς παρέχουν το σημαντικότερο σημείο αναφοράς για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων δείκτη. Το κάπνισμα μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα CEA σε υγιή άτομα.

Ακρίβεια

Η ενδιάμεση ακρίβεια υπολογίστηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες EP5-A (7) του NCCLS με τη χρήση τεσσάρων επιπέδων κατεψυγμένων ποσοτήτων ανθρώπινου ορού που περιέχουν πρόσθετο CEA και δύο διαφορετικούς συνδυασμούς αντιδραστηρίων CanAg CEA EIA. Κάθε δείγμα χορηγήθηκε τυχαίοποιημένα με πιπέτα (n=2/ανάλυση) και αναλύθηκε δύο φορές κάθε ημέρα, για 20 ημέρες.

Δείγμα	Επαναλήψεις	Μέση τιμή (μg/L)	Τυπική απόκλιση SD στον ίδιο αναλυτικό κύκλο (μg/L)	Συντελεστής μεταβλητότητας στον ίδιο αναλυτικό κύκλο CV%	Τυπική απόκλιση SD μεταξύ ημερών (μg/L)	Συντελεστής μεταβλητότ. μεταξύ ημερών CV%
CEA 1	80	2,78	0,07	2,5	0,08	2,7
CEA 2	80	5,97	0,15	2,6	0,11	1,8
CEA 3	80	20,8	0,44	2,1	0,36	1,7
CEA 4	80	57,3	1,57	2,7	0,87	1,5

Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης της CanAg CEA EIA είναι $\leq 0,25$ μg/L, το οποίο ορίζεται ως τη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη μέση τιμή απορρόφησης του βαθμονομητή CEA 0 συν 2 τυπικές αποκλίσεις σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL 0}}{\text{OD CAL 2} - \text{OD CAL 0}} \times 2 \text{ μg/L}$$

Ανάκτηση

Προετοιμάστηκαν εμπλουτισμένα δείγματα ορού με την προσθήκη ανθρώπινου αντιγόνου CEA σε φυσιολογικά δείγματα ορού. Η ανάκτηση του πρόσθετου αντιγόνου ήταν εντός της περιοχής 90-115%.

Φαινόμενο άγκιστρου

Όταν μετρείται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 405 nm, π.χ. με τη χρήση της προαιρετικής διαδικασίας δοκιμής με την προσθήκη διαλύματος τερματισμού, δεν παρατηρήθηκε φαινόμενο άγκιστρου για τα δείγματα που περιέχουν μέχρι 250.000 µg/L. Όταν η απορρόφηση μετρείται σε μήκος κύματος 620 nm, τα εξαιρετικά υψηλά δείγματα μπορεί να αλλάξουν το χρώμα του υποστρώματος από μπλε σε πρασινόχρουν. Αυτό μπορεί να δώσει ψευδώς χαμηλή απορρόφηση που μπορεί να εμπίπτει εντός της περιοχής καμπύλης βαθμονόμησης και να παρατηρηθεί ως άγκιστρο. Αυτό το φαινόμενο άγκιστρου σε μήκος κύματος 620 nm έχει παρατηρηθεί για δείγματα που περιέχουν περισσότερα από 2000 µg/L.

Για να αποφευχθεί η παραπλανητική αναφορά χαμηλών αποτελεσμάτων λόγω του φαινομένου άγκιστρου όταν η απορρόφηση μετρείται σε μήκος κύματος 620 nm, συνιστάται η χρήση της προαιρετικής διαδικασίας δοκιμής και ο προσδιορισμός της απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm για ασθενείς στους οποίους πραγματοποιήθηκε ανάλυση για πρώτη φορά ή για ασθενείς για τους οποίους αναμένονται πολύ υψηλές τιμές CEA.

Γραμμικότητα

Τα δείγματα ασθενούς αραιώθηκαν διαδοχικά με βαθμονομητή CEA 0 και αναλύθηκαν. Οι τιμές που ελήφθησαν ήταν μεταξύ 90–120% των αναμενόμενων τιμών.

Ειδικότητα

Η CanAg CEA EIA βασίζεται σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, το προσελκύν μονοκλωνικό αντίσωμα 12-140-10 έναντι επίτοπου Gold IV και το ανιχνεύον μονοκλωνικό αντίσωμα 12-140-1 έναντι επίτοπου Gold V (4, 5). Ακολουθήθηκε η κατευθυντήρια οδηγία EP7-P (8) του NCCLS για τον προσδιορισμό πιθανών πηγών παρεμβολών. Οι παρακάτω ουσίες και συγκεντρώσεις εξετάστηκαν και βρέθηκαν ότι δεν παρεμβαίνουν στην εξέταση.

	Συγκέντρωση χωρίς σημαντική (± 10%) παρεμβολή
Λιπαίμια (Intralipid®)	10 mg/mL
Χολερυθρίνη, μη συζευγμένη	0,6 mg/mL
Αιμοσφαιρίνη	5 mg/mL

Σύγκριση μεθόδων

Η CanAg CEA EIA συγκρίθηκε με το kit Wallac Delfia CEA. Μετρήθηκαν 77 δείγματα ανθρώπινου ορού με τιμές που κυμαίνονται από 0-790 μg/L και οι αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης των αποτελεσμάτων έδωσαν τα εξής:

$$\text{CanAg CEA} = 0,90 \times \text{Delfia CEA} + 0,53 \quad r = 1,00$$

ΕΓΓΥΗΣΗ

Η λήψη των δεδομένων απόδοσης που παρουσιάζονται εδώ έγινε με τη διαδικασία δοκιμής που αναφέρεται. Οποιαδήποτε αλλαγή ή τροποποίηση της διαδικασίας που δεν συνιστάται από την Fujirebio Diagnostics AB μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Σε αυτή την περίπτωση, η Fujirebio Diagnostics AB αποποιείται όλων των εγγυήσεων, ρητών, σιωπηρών ή θεσμικών, συμπεριλαμβανομένης σιωπηρής εγγύησης εμπορευσιμότητας και καταλληλότητας για χρήση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gold P. and Freedman S. O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp Med* 122: 467–481.
2. Thompson J.A. and Zimmerman W. (1988) The carcinoembryonic antigen gene family: Structure, expression and evolution. *Tumor Biol.*; 9: 63–83.
3. Börner, O.P. (1992) Thesis "Immunoassays for Carcinoembryonic antigen, Specificity and Interferences", ISBN 82–7633–014–2.
4. Hammarström S. et al. (1989) Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 49: 4852–4858.
5. Tumor Marker Expert Panel, ASCO (1996) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin Oncol*; 14: 2843–2877.
6. Fleisher M. et al. (2002) Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. *National Academy of Clinical Biochemistry* 15: 26-29.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).



Το CanAg® είναι σήμα κατατεθέν της Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälvs gata 13
SE-414 55 Göteborg
Sweden
Τηλέφωνο + 46 31 85 70 30
Φαξ + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com