

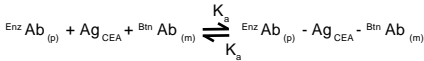
FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de concentração de antígeno Carcinoembriogênico (CEA) em soro humano, por Enzimaimunoensaio em Microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrico

Nesta metodologia são pipetados inicialmente, nas microcavidades da placa, os padrões de referência, amostras de pacientes. Em seguida, adiciona-se o Conjugado Enzimático Policlonal e Anticorpos Biotina monoclonal (diretamente contra epitopes diferentes e distintas de CEA) e a reação é homogeneizada. A reação entre os vários anticorpos de CEA e o CEA natural formam um complexo sanduíche que liga com a streptavidina revestida no poço. Essa interação é ilustrada pela seguinte equação:



Onde:

${}^{Bn}Ab_{(m)}$ = Anticorpo monoclonal biotinado (Quantidade excessiva)

Ag_{CEA} = Antígeno nativo (Quantidade variável)

${}^{Enz}Ab_{(p)}$ = Anticorpo policlonal classificado como enzima (Quantidade excessiva)

${}^{Enz}Ab_{(p)} - Ag_{CEA} - {}^{Bn}Ab_{(m)}$ = Complexo Sanduíche antígeno-anticorpo

K_a = razão constante de associação

K_a = razão constante de dissociação

Após completado o período de incubação exigido, o conjugado anticorpo-enzima-CEA é separado do conjugado enzima-CEA solto por aspiração ou decantação. A atividade da enzima presente na superfície do poço é quantificada pela reação com um substrato próprio para produzir cor. O uso de várias referências de padrões de níveis de antígeno carcinoembriogênico (CEA) permite a construção de uma curva de atividade e concentração. Através da comparação com a curva de calibração, pode ser encontrada a concentração de CEA de uma amostra desconhecida.

REAGENTES

1- Padrões de referência (A-F)

6 (seis) frascos (A-F) de padrões de referência de antígeno f β – CEA em diferentes concentrações em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica. Estocar a 2-8 °C.

A = 0,0 ng/mL

B = 5,0 ng/mL

C = 10,0 ng/mL

D = 25, ng/mL

E = 50,0 ng/mL

F = 250,0 ng/mL

2-Conjugado Enzimático-Policlonal e Anticorpo Monoclonal Biotinado (E)

Enzima purificada ligada com anticorpo, Antígeno IgG de rato biotinado em tampão, corante e azida sódica.

Armazenar a 2-8 °C.

3- Placa Revestida com Streptavidina (U)

Armazenar a 2-8 °C.

4 - Solução de lavagem concentrada (D)

Solução de fosfato salina pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 30°C.

5 - Substrato A (S^A)

Tetrametilbenzidina (TMB). Estocar entre 2 e 8°C.

6 - Substrato B (S^B)

Solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estocar entre 2 e 8°C.

7 - Solução de parada



Ácido Clorídrico (HCl) 1N .Estocar entre 2 e 30°C.

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	96 microcavidades
1 - Padrões de Referência	6 Frasco x 1,0 mL
2 - Conjugado Enzimático Policlonal e Anticorpo Monoclonal Biotinado	1 Frasco x 13 mL
3 - Placa sensibilizada acondicionada em embalagem de alumínio, com sílica (anti-umidade)	1 Unidade x 96 poços
4 - Solução de lavagem concentrada	1 Frasco x 20 mL
5 - Substrato A	1 Frasco x 7 mL
6 - Substrato B	1 Frasco x 7 mL
7 - Solução de Parada	1 Frasco x 8 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Material contido no kit :

- Reagentes descritos no quadro anterior

-Instruções de uso (manual)

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1) Pipeta(s) com capacidade de dispensar volumes de 25 μ L e 50 μ L , com precisão maior que 1,5%.
- 2) Repipetador(es) para dispensagens repetitivas de volumes de 100 μ L e 300 μ L , com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3) Lavadora de microplaca (opcional) ou pipetas para lavagem das microcavidades.
- 4) Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 / 630 nm de comprimento de onda.
- 5) Pipetas com volumes reguláveis (200 μ L a 1000 μ L) para diluição do Substrato.
- 6) Tubos de ensaio para a diluição do Substrato A e B.
- 7) Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8) Embalagem plástica ou cobertura de microplaca para os passos de incubação.
- 9) Cronômetro ou relógio
- 10) Frasco para estocar a solução de lavagem.
- 11) Água destilada ou deionizada.
- 12) Ferramentas de Controle de Qualidade.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. **Não congelar.** Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2 - 8° C.
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, ions diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;
- 6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.
- 7 - Toda matéria-prima do produto é testado e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro humano é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
- 8 - Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina.

AMOSTRAS

As amostras devem ser de soro e as precauções e tipos usuais de punção venosa devem ser observadas na coleta. Para uma comparação acurada de valores estabilizados normais, a amostra de soro deve ser obtida pela manhã. O sangue deve ser coletado em tubo sem aditivos. Deixar o sangue coagular. Centrifugar a amostra para separar o soro das células.

Amostra(s) hemolizadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C , pelo período máximo de 5 (cinco) dias. Se as amostras não puderem ser analisadas nesse período, congelar e armazenar à temperatura de -20°C por até 30 dias. Evitar congelamento e descongelamento repetitivos. Quando o teste for duplicado, é necessário 0,050 mL de amostra.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de lavagem

Diluir o conteúdo do frasco n° 4 Solução de Lavagem Concentrada (D) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar em temperatura ambiente até a validade impressa no frasco original.

2) Substrato – Solução de trabalho

Determinar a quantidade necessária de cavidades a serem utilizadas para preparo de uma quantidade adequada. Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B.

Para cada microcavidade (teste):

50 μ L de Substrato A + 50 μ L de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes).

PREPARAR IMEDIATAMENTE ANTES DO USO.

Usar no máximo, até uma (1) hora após preparo.

TÉCNICA

Antes de começar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras, padrões de referência e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30 °C).

- 1) Separar as microcavidades a serem utilizadas considerando: Padrões, controles e amostras (podendo ser testados em duplicata.)
- 2) Pipetar 0,025 mL (25 μ L) do padrão apropriado, controle e amostra em suas respectivas microcavidades.
- 3) Pipetar 0,100 mL (100 μ L) de conjugado (biotinado/enzima) em cada microcavidade.
- 4) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente.
- 5) Descartar o conteúdo da placa por decantação ou aspiração, (Lavadora).
- 6) Pipetar aproximadamente 300 μ L de solução de **lavagem previamente preparada** (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO) em todas as microcavidades. Repetir esse passo para um total de cinco (5) ciclos de lavagens. Para a garantia da secagem da placa, bater em papel absorvente.
- 7) Pipetar 0,100 mL (100 μ L) do Substrato **previamente preparado** em todas as microcavidades. (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- 8) Incubar por 15 (quinze) minutos em temperatura ambiente **ao abrigo da luz.**
- 9) Pipetar 0,050 mL (50 μ L) de Solução de parada para cada microcavidade e misturar gentilmente por 15-20 segundos.
- 10) Ler a absorvância em cada microcavidade em 450/630 nm na leitora de ELISA. **Os resultados devem ser lidos dentro de 30 (trinta) minutos após a adição da Solução de parada.**

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de CEA em amostras desconhecidas (pacientes).

Preparo da curva de calibração

- 1) Registrar as absorvâncias obtidas na leitora de microplaca como discriminado no Exemplo 1;
- 2) Plotar as absorvâncias de cada padrão de referência versus a concentração de CEA correspondente em ng/mL em papel milimetrado (não fazer a média das referências antes de plotá-las no gráfico). Traçar a curva.

Padrões	Microcavidade	Abs. (60 min.)
A (0 ng/mL)	1	0,017
	2	0,019
B (5,0 ng/mL)	3	0,160
	4	0,159
C (10,0 ng/mL)	5	0,231
	6	0,224
D (25 ng/mL)	7	0,431
	8	0,418
E (50 ng/mL)	9	1,776
	10	1,763
F (250 ng/mL)	11	2,851
	12	2,880

Especificidade

Nenhuma interferência foi detectada após a adição das seguintes substâncias a amostras de soro:

Ácido acetil salicílico	100 µg/mL
Ácido ascórbico	100 µg/mL
Cafeína	100 µg/mL
AFP	10 µg/mL
PSA	1,0 µg/mL
Ca-125	10.000 U/mL
hCG	1000 UI/mL
hLH	10 UI /mL
hTSH	100 mUI /mL
hPRL	100 µg/mL

SIGNIFICADO CLÍNICO

O antígeno carcinoembriogênico é uma glicoproteína com peso molecular de 180 kDa. CEA é a primeira das chamadas proteínas carcinoembriogênicas, que foi descoberta em 1965 por Gold e Freeman (1). CEA é o marcador mais usado para câncer gastrointestinal. Embora o CEA seja primariamente associado ao câncer colo-retal, outros tipos de câncer podem causar níveis elevados de CEA como mama, pulmão, estômago, pâncreas, ovário e outros órgãos. Condições benignas também causam aumento dos níveis normais, inclusive inflamação de pulmão e do trato gastrointestinal (GI) e câncer de fígado benigno (2,3). Fumantes, como um grupo, tem um nível maior que a normal de concentração de CEA.

NUMÉRO DE TESTES

96 Testes

1. Gold P., Freedman S.O., J. Exp Med, 121, 439 (1965).
2. Zamcheck N., Adv Intern Med., 19, 413 (1974).
3. Rayncao G., Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972).
4. Wild D., The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994) p444.

GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
e-mail bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente Tel.: 0800 0315454.
e-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do Kit de Biolisa CEA na ANVISA: 10269360170

Revisão: Setembro/09

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A) Performance do ensaio:

É importante que o tempo de reação em cada microcavidade seja observado constantemente para a reprodução dos resultados. Pipetar as amostras não deve levar mais que 10 (dez) minutos para evitar desvio do teste. Se mais de 1 (uma) placa for usada, é recomendável repetir a resposta da curva-padrão. A adição da solução de substrato inicia uma reação cinética, a qual se finda com a adição da solução de parada. Entretanto, a adição do substrato e da solução de parada deve ser processada na mesma seqüência para eliminar qualquer desvio de tempo durante a reação. Leitoras de elisa medem verticalmente. Não tocar na base das microcavidades. Falhas no processo de lavagem podem resultar em resultados imprecisos ou incorretos. Amostras de paciente com concentração de CEA acima de 250 ng/mL devem ser diluídas (por exemplo 1/10 ou maior) com soro masculino normal (CEA < 5 ng/mL) e re-testadas. A concentração de amostra é obtida multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição (10). Cada componente em um teste deve ser do mesmo número de lote e estocado sob condições idênticas.

B. Interpretação

Se for usado um programa para interpretar os resultados, é imprescindível que se estabeleça uma margem de erro de 10% para os resultados dos calibradores e amostras. O CEA tem baixa sensibilidade e especificidade como um marcador tumoral. Clinicamente, um valor elevado de CEA sozinho não é um valor diagnóstico como um teste específico para câncer e deve ser usado em conjunto com outras manifestações (observações) clínicas e parâmetros diagnósticos. Existem pacientes com câncer colo-retal que não apresentam valores de CEA elevados e os valores de CEA elevados nem sempre mudam com a progressão ou regressão da doença. Fumantes demonstram valores maiores que os não-fumantes.

CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

Cada laboratório deve testar os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar a performance dos ensaios, estabelecendo seus próprios valores de referência

Parâmetros do Controle de Qualidade :

Absorbância Máxima (250 ng/mL) = > 1,5

VALORES DE REFERÊNCIA

Valores de Referência para Teste de CEA / Elisa

Não-fumantes < 5 ng/mL
Fumantes < 10 ng/mL

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O BIOLISA-CEA foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente. Foram utilizadas 48 amostras de população normal, fumantes e não fumantes. A equação de regressão linear obtida, foi $y = 0,9534x + 0,1497$ e o coeficiente de correlação 0,9974. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens consecutivas com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (ng/mL)	2,06	7,09	30,05
Desvio Padrão (ng/mL)	0,09	0,28	1,40
Coefficiente de Variação (%)	4,41	3,93	4,65

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, durante 3 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados :

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (ng/mL)	2,09	7,09	30,29
Desvio Padrão (ng/mL)	0,03	0,05	0,47
Coefficiente de Variação (%)	1,44	0,71	1,55

Sensibilidade

O Biolisa-CEA tem uma sensibilidade de 0,025 ng. Isto é equivalente a uma amostra contendo 1 ng/mL de concentração de CEA.

Linearidade

A reação é linear até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, diluir a mesma com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.