

НАБОР ИФА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ КАРЦИНОЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (СЕА)

5201-16, СЕА ELISA

Каталог. № : 5201-16
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 10-24-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Количество тестов	96 тестов
Тест	СЕА ELISA
Метод	ИФА: Твердофазный иммуносорбентный анализ
Принцип	Сэндвич-комплекс
Диапазон обнаружения	0-120 нг/мл
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	95 %
Чувствительность	1,0 нг/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок хранения	12-14 мес.

**Лабораторные анализы не могут быть единственными критериями для медицинского заключения. История болезни пациента и последующие тесты должны быть приняты во внимание*

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА СЕА предназначен для количественного определения концентрации карциноэмбрионального антигена в сыворотке человека.

ВВЕДЕНИЕ

Карциноэмбриональный антиген (СЕА) это клеточно-поверхностный гликопротеин. В 1969 г. было обнаружено, что СЕА плазмы увеличивался в 35 из 36 пациентов с раком ободочной кишки и титры СЕА уменьшались после успешного хирургического вмешательства. Уровень нормы был отмечен в пациентов с другими формами рака или при начале болезни. Последующие изучение не внесли ничего нового в начальные результаты и теперь ясно, что уровень СЕА растет при разных формах рака. Рост уровня СЕА обнаружено в более чем 30% пациентов с раком легких, печени, поджелудочной железы, груди, ободочной кишки, головы или горла, мочевого пузыря, шейки матки и простаты. Рост уровня плазмы СЕА зависит от стадии и степени болезни, дифференциации опухоли и размеров метастазы. СЕА также обнаружено в здоровой ткани.

ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор DAI СЕА ELISA основывается на принципе твердофазного ферменто-связанного иммуносорбентного анализа. Система набора использует одно моноклональное анти-СЕА антитело для твердо фазовой иммобилизации (микрочип) и другое мышиное моноклональное анти-СЕА антитело в растворе конъюгата антитело-фермент (пероксидаза хрена). Стандарты и тестовые образцы (сыворотка) добавляются в микрочипные лунки, покрытые антителом СЕА. Потом добавляется антитело СЕА, меченное пероксидазой хрена (конъюгатом). Если человеческий СЕА присутствует в образце, он связывается с антителом на лунке и ферментным конъюгатом, в результате СЕА молекулы будут в сэндвиче между твердой фазой и ферменто-связанными антителами. После 1-часовой инкубации при комнатной температуре лунки промываются водой для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется 20 минут, в результате чего происходит развитие голубого окраса. Развитие окраса останавливается добавлением стоп раствора. Окрас изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрическим методом при 450 нм. Концентрация СЕА прямо пропорциональна интенсивности цвета в тестовом образце.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Сыворотка должна быть приготовлена с цельной крови, собранной подходящей медицинской методикой и сыворотка должна быть отделена от красных телец крови как можно быстрее. Избегайте сильно гемолизированной, липемической и мутной сыворотки.
2. Образцы плазмы, собранные в пробирки, содержащие ЭДТА, гепарин или оксалат, могут влиять на процедуру теста и их необходимо избегать.
3. Образцы необходимо закрыть и хранить 48 часов при 2-8°C до начала анализа. Образцы для более длительного срока хранения необходимо заморозить до -20°C. Размороженные образцы следует перемешать перед тестированием.

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Поставляемые материалы в наборе для исследования:

1. Микротитровальный планшет, покрытый антителами на 96 лунок.
2. Стандарты СЕА, содержащие 0, 3, 12, 30, 60 и 120 нг/мл СЕА, готовые к использованию, 1 набор.
3. Реагент ферментного конъюгата, 12 мл;
4. Субстрат ТМВ, 12 мл;
5. Стоп-раствор, 12 мл;
6. Концентрат промывочного буфера (50x), 15 мл.
7. Контрольный набор (опционно) x 1

Необходимые, но не поставляемые материалы.

1. Точные пипетки: 0,04 - 0,2 мл.
2. Сменные наконечники к пипеткам.
3. Дистиллированная вода.
4. Вихревой смеситель или аналог.
5. Промокательная бумага или бумажное полотенце.
6. Графопостроительная бумага.
7. Микротитровальный планшет-ридер.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием все реагенты должны быть приведены к комнатной температуре (18-22°C) и перемешаны легким переворачиванием или покачиванием. Избегайте образования пены.
2. Перерастворите каждый лиофилизированный стандарт 0,5 мл дистиллированной воды. Оставьте перерастворенный материал по крайней мере на 20 минут. Перерастворенные стандарты должны храниться закрытыми при 2-8°C.
3. Разбавьте 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разбавьте 15 мл промывочного буфера (15x) дистиллированной водой, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешать.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Закрепите в держателе нужное количество привитых лунок.
2. Внесите в соответствующие лунки по 50 мкл стандартов, образцов и контролей.
3. Внесите в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.
4. Тщательно перемешайте на протяжении 10 секунд. Очень важно на данном этапе достичь полного смешивания.
5. Инкубируйте течение 60 минут при комнатной температуре (18-22°C).
6. Удалите инкубационную смесь планшета в контейнер для отходов.
7. Промойте и опорожните микротитровальные лунки промывочным буфером (1x) 5 раз.
8. Резко встряхните планшетом о промокательную бумагу или бумажные полотенца, чтобы удалить все остатки воды.
9. Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМВ. Легко смешивайте 5 секунд.
10. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
11. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку.
12. Легко смешивайте 30 секунд. Очень важно, чтобы весь голубой цвет стал желтым.
13. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм в течении 15 минут.

Внимание:

1. Процедура промывки имеет большое значение. При недостаточно тщательном промывании результаты будут неточными, и уровень оптической плотности лунок будет завышен.
2. В случае ручного пипетирования не рекомендуется в одном анализе использовать более 32 лунок, так как внесение всех калибровочных, контрольных и исследуемых образцов не должно занимать более 3 минут. В случае автоматического пипетирования можно использовать весь планшет из 96 лунок.

3. Хотя дублирование всех стандартов и образцов не требуется, но рекомендуется.

32X	3.23	3.51	108.5
Среднее восстановление: 99.7 %			

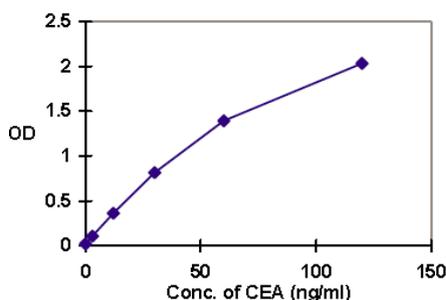
ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определите среднюю абсорбцию для каждого набора стандартов, контроля и образцов. Используя линейную или полупологарифмическую бумагу, отметьте точки значений поглощения стандартов в нг/мл на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X. Используйте среднее значение поглощения для каждого образца, чтобы определить соответствующее значение концентрации СЕА в нг/мл простой интерполяцией с калибровочной кривой.

Пример типичной калибровочной кривой

Результаты типичного измерения поглощения стандартов против концентрации СЕА. Следующие данные предназначены только для демонстрации и не должны использоваться во время тестирования:

СЕА (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,019
3	0,105
12	0,362
30	0,814
60	1,390
120	2,032



ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Наиболее полное изучение СЕА было получено совместным изучением, в котором были проанализированы 35,000 образцов в более чем 10,000 пациентов. У 1425 нормальных некурящих субъектов уровень 98,7% имели значение меньше 5.0 нг/мл. Рекомендуется, чтоб каждая лаборатория устанавливала собственные границы. Минимальная определяемая набором концентрация СЕА 1.0 нг/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Достоверность: сравнение между нашим тестом и коммерчески доступным тестом предоставило следующие данные:

N = 46
 Коэффициент корреляции = 0.946
 Наклон = 0.788
 Пересечение = 0.74
 Среднее (наши наборы) = 7.59
 Среднее (Abbott) = 6.03

II. Точность:

1) Внутрисерийная:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	24	5.07	0.173	3.4
Уровень 2	24	20.3	0.744	3.7
Уровень 3	24	35.44	1.09	3.1

2) Между сериями:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	4.94	0.243	4.9
Уровень 2	20	19.82	1.24	6.3
Уровень 3	20	35.36	1.33	3.8

III. Линейность:

Две сыворотки пациента серийно разводили Стандартом 0 нг/мл в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 99.7 %.

Образец			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	103.50	103.50	
2X	51.75	50.89	98.3
4X	25.88	26.26	101.5
8X	12.94	13.22	102.2
16X	6.47	6.25	96.6

IV. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известным уровнем пролактина смешивались и анализировались в дубликатах. Среднее восстановление составило 100.7 %.

Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
54.28	53.21	98.0
28.42	29.13	102.5
23.85	22.98	96.4
16.53	15.99	96.7
20.90	21.36	102.2
18.62	19.65	105.5
28.77	29.78	103.5
Среднее восстановление: 100.7 %		

V. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 1.0 нг/мл.

VI. Перекрестная реактивность

Следующие антигены маркеров рака в высоких концентрациях были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Concentration	Equivalent CEA	% Cross-reactivity
hCG	400 IU/mL	0.00	0.00
PAP	1,000 ng/mL	0.00	0.00
PSA	1,000 ng/mL	0.00	0.00
AFP	1,000 ng/mL	0.00	0.00

VII. Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался при концентрациях 40.000 нг/мл СЕА.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Достоверные результаты будут достигнуты только при полном понимании инструкции к набору.
2. Процедура промывки очень важна. Недостаточное промывание приведет к низкой точности и ошибочно повышенным считываниям абсорбции.
3. Гетерофильные антитела, такие как человеческие анти-мышинные антитела (НАМА) часто обнаруживаются в сыворотке человека. Эти антитела могут сильно влиять при некоторых иммунодиагностических процедурах. Настоящий набор разработан для минимизации этого влияния. Но полное исключение этого влияния для всех образцов пациентов невозможно гарантировать. Полученные результаты должны оцениваться в комплексе с остальными методами исследования и клиническими данными.

ХРАНЕНИЕ

Невыскртытые наборы должны храниться после получения при 2-8 °C. Для минимизации влияния влажного воздуха микротитровальный планшет должен храниться при 2-8 °C в запечатанном виде вместе с осушителями. Открытые наборы остаются стабильными до окончания срока годности, при условии, что они хранятся с соблюдением вышеуказанных условий. Микротитровальный планшет-ридер с шириной дорожки 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-2 или больше при 450 нм, является приемлемым для использования в измерении абсорбции.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
 ул. Чорновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com