

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (СЕА)

EIA-1868, СЕА ELISA

Каталог. № : EIA-1868
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 09-2015
Версия 4.0



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения Раково-эмбрионального антигена в сыворотке крови.

1.1 Вступление

Раково-эмбриональный антиген (СЕА) это клеточно-поверхностный 200 кд гликопротеин. В 1969 г. было исследовано, что плазма СЕА увеличивалась в 35 из 36 пациентов с раком ободочной кишки и СЕА титры уменьшались после успешного хирургического вмешательства. Нормальный уровень 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 нормальных тканях.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG СЕА ELISA базируется на принципе твердофазового ферментно связанного иммуносорбентного теста. Система набора использует моноклональные антитела, направленные против интактных СЕА молекул для иммобилизации на твердой фазе (лунки планшетки). Козлиное анти-СЕА антитело конъюгировано с пероксидазой (HRPO) и содержится в растворе антитело-ферментного конъюгата. Образец тесту дает возможность реагировать одновременно с двумя антителами, результат в СЕА молекулах будет разделенный между твердофазовыми и ферментными антителами. После одного часа инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанного антигена. Добавляется раствор ТМБ и инкубируют при комнатной температуре 20 минут, что приводит к образованию голубого цвета. Развитие цвета останавливают добавлением 1N HCl, изменяя голубой цвет на желтый. Концентрация СЕА прямо пропорциональна интенсивности цвета образца. Абсорбция измеряется на фотометре при 450 нм.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике. Только для профессионального использования.
2. Перед началом анализа полностью и внимательно прочитать инструкции. Использовать действующую версию инструкции, поставляемой с набором. Убедиться, что все понятно.
3. Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы утвержденными методами и дали отрицательные результаты с ВИЧ 1/2, HBsAg и HCV. Со всеми реагентами обращаться как с потенциально опасными.
4. Избегать контакта со стоп-раствором, содержащим 0.2 моль/л H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
5. ТМБ раствор вреден. Вызывает раздражение кожи и слизистой. В случае возможного контакта промыть глаза с достаточным количеством воды и вымыть руки с мылом и водой. Вымыть загрязненные предметы перед их повторным использованием. Вывести человека на свежий воздух при вдыхании.
6. Микропланшет состоит из отделяющихся полосок. Неиспользованные лунки должны храниться при 2-8 °C в запечатанной упаковке и должны использоваться с поставляемой рамкой.

7. Пипетирование образцов и реагентов должно проводиться как можно быстрее и с одинаковыми промежутками для каждого шага.
8. Резервуары использовать только для одиночных реагентов. Особенно это касается резервуаров с субстратами. Использование резервуаров, бывших в употреблении с раствором конъюгата, может привести к окрасу раствора. Не помещать реагенты обратно в пробирки во избежание загрязнения.
9. Для получения надлежащих результатов, тщательно перемешивать содержимое лунок. Не использовать лунки повторно.
10. Не допускать высушивания лунок в процессе тестирования; добавлять реагенты немедленно после завершения шага промывки.
11. Привести реагенты к комнатной температуре (21-26 °C) перед тестированием. Температура может исказить результаты оптической плотности анализа. Тем не менее, это не повлияет на результаты тестируемых образцов.
12. Не пипетировать ртом. Избегать контакта с кожей и слизистой.
13. Не употреблять пищу, не пить и не пользоваться косметикой в области работы с реагентами.
14. При работе с образцами и реагентами использовать одноразовые перчатки. Микробное загрязнение реагентов или образцов может привести к ложным результатам.
15. Обращаться с реагентами в соответствии с установленными нормами.
16. Не использовать после окончания срока годности.
17. Соблюдать все указанные объемы. Оптимальные результаты возможны только при использовании калиброванных пипеток и считывающего устройства микропланшета.
18. Не смешивать компоненты из разных наборов и партий.
19. Химикаты и приготовленные или использованные реагенты уничтожать в соответствии с установленными правилами.
20. За дополнительной информацией обратиться к производителю.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые материалы

1. **Планшетка** на 96 лунок (12x8)
2. **Стандарт 0**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию; Содержит не ртутный консервант.
3. **Стандарты 1-5**, 5 пробирок, 1 мл, готовы к использованию; Концентрации: 5, 10, 25, 50 и 100 нг/мл Содержит не ртутный консервант.
4. **Контроль Высокий и Низкий**, 2 флакона (лиофилизированные), 1,0 мл каждый (см. «Приготовление Реагентов»). Содержит не ртутный консервант.
5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 14 мл. Готов к использованию. Содержит не ртутный консервант.
6. **Субстратный раствор**, 1 флакон, 14 мл. Готов к использованию, ТМБ.
7. **Стоп раствор**, 1 флакон, 14 мл. Готов к использованию. Содержит 0.5 M H₂SO₄. Избегать контакта со стоп раствором.
8. **Промывочный Раствор**, 1 флакон, 30 мл (40x концентрированный), см. «Приготовление Реагентов».

Примечание: Дополнительный 0 Стандарт для разведения образцов доступен по запросу.

4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм (±10 нм).
- Точные микропипетки разного объема.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Миллиметровая бумага или ПО.

4.3 Хранение набора

При температуре хранения от 2 до 8 °C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты использовать не рекомендуется. Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8 °C. Микропланшета должна храниться при 2-8 °C. После вскрытия фольгированного пакета при хранении пакет необходимо держать плотно закрытым. Иммуноактивность лунок сохраняется приблизительно в течение двух месяцев при хранении во вскрытом, но плотно закрытом пакете с влагопоглотителем.

4.4 Подготовка реагентов

Перед использованием необходимо довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Контроль

Разбавьте лиофилизированные стандарты 1.0 мл дистиллированной воды. Оставьте их на 10 минут и мягко смешайте.

Примечание: Приготовленный контроль разделить на порции и хранить при -20 °С.

Промывочный раствор

Добавить деионизированную воду к концентрированному промывочному раствору.

Развести 30 мл концентрата *Промывочного Раствора* с 1170 мл деионизированной воды до конечного объема 1200 мл.

Стабильность после разведения: 2 недели при КТ.

4.5 Утилизация набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с официальными государственными правилами. Вся необходимая информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности.

4.6 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Не рекомендуется тестировать поврежденные наборы.

5. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Примечание: Не использовать образцы, содержащие азид натрия.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного сворачивания. Образцы пациентов, проходящих антикоагулянтную терапию, потребуют больше времени для сворачивания.

5.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы могут храниться накрытыми в течение 2 дней при температуре 2-8 °С. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20 °С. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Если в исходном исследовании образец сыворотки содержит стандарт, превышающий самое высокое значение, образцы могут быть разведены с 0 *Стандартом* и повторно исследованы согласно пункту Процедура анализа.

Для подсчета концентраций необходимо учитывать данный фактор разведения.

Например:

a) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотки + 90 мкл 0 *Стандарта* (тщательно смешать)

b) разведение 1:100: 10 мкл разведения a) 1:10 + 90 мкл 0 *Стандарта* (тщательно смешать)

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Основные замечания

- Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры. Реагенты необходимо смешать без образования пены.
- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.
- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Проведение анализа

Для каждого анализа необходимо строить стандартную кривую.

Все стандарты, образцы и контроли должны исследоваться одновременно в дублях с тем, чтобы соблюдать одинаковые условия анализа.

1. Закрепите требуемое количество микротитровальных лунок в держателе.

2. Пипеткой внесите **50 мкл *Стандарта*, *Контроля* и *образцов новыми одноразовыми наконечниками*** в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **100 мкл *Ферментного Конъюгата*** в каждую лунку. Тщательно перемешайте на протяжении 10 секунд. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте течение **60 минут** при комнатной температуре.
5. Вытряхните содержимое лунок.
Промойте дистиллированной или неионизированной водой **3 раза *Промывочным Раствором*** (400 мкл на лунку). Резко встряхните планшет над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.
ПРИМЕЧАНИЕ: от правильности проведения промывки зависит чувствительность и точность анализа!
6. Добавьте **100 мкл *Субстратного Раствора*** в каждую лунку.
7. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **100 мкл *Стоп Раствора*** в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность ячеек при **450 ± 10 нм** в течение **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Подсчитать средние значения оптической плотности для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.
2. Построить стандартную кривую, нанося среднее значение оптической плотности, полученной от каждого стандарта в отношении к его концентрации со значением оптической плотности на вертикальной оси (Y) и концентрации на горизонтальной оси (X).
3. Используя среднее значение каждого образца определить соответствующую концентрацию из стандартной кривой.
4. Автоматический метод: Компьютерные программы, использующие кубический сплайн, 4 PL (4 Parameter Logistics) или Logit-Log в общем могут дать хороший результат.
5. Концентрацию образцов можно считать с этой стандартной кривой. Образцы с концентрациями, превышающими самое высокое значение, требуют дальнейшего разведения или принимаются как > 100 нг/мл. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимания этот фактор разведения.

6.3.1 Пример типичной Калибровочной кривой

Следующие данные приведены только в качестве демонстрации и не могут быть использованы для расчетов.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Нулевой 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. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные и нетипичные значения.

Результаты вполне соответствуют установленным значениям cut-offs (5 нг/мл для некурящих и 10 нг/мл для курящих).

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными положениями. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения надежности результатов. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты QC-Лаборатории приведены в сертификате качества, прилагаемом к набору. Значения и диапазоны так же указаны в сертификате качества, прилагаемом к данному лоту набора и должны использоваться для сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать государственные и международные программы контроля качества с тем, чтобы обеспечить точность результатов.

Применяйте соответствующие статистические методы для исследования контрольных значений и отклонений. Если же результаты не совпадают с установленными допустимыми значениями контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные.

В этом случае проверьте следующие технические параметры: пипетирующие и измеряющие время приборы; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, методы промывки и аспирации.

После проверки вышеуказанных параметров, не обнаружив никаких ошибок, обратитесь к своему дистрибьютору или непосредственно в DRG.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон исследования

Диапазон исследования 0.596 – 100 нг/мл.

9.2 Специфичность антител (Перекрестная реактивность) не выявлена.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была подсчитана из среднего и двух стандартных отклонений двадцати повторных анализов нулевого стандарта и была определена как < 0.596 нг/мл.

9.4 Точность

Вариация внутри анализа – 3,2% - 4,8%.
Вариация между анализами – 4,0% - 6,5%.

9.5 Восстановление

Образцы насыщались добавлением растворов СТФ с известными концентрациями в соотношении 1:1.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация (нг/мл)	3.3	18.3	47.1
Среднее восстановление (%)	90.3	89.4	101.1
Диапазон			
восстановления (%)	от 87.6	85.8	92.5
	до 95.6	95.2	107.0

9.6 Линейность

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация (нг/мл)	17.7	44.6	85.3
Среднее восстановление (%)	109.3	96.7	99.9
Диапазон			
восстановления (%)	от 105.7	89.9	93.1
	до 114.6	100.4	106.3

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

10.1 Интерферирующие вещества

Любое неточное обращение с образцами или изменение данного исследования может повлиять на результаты.

Следует избегать использования гемолитической, иктерической и липемической сыворотки.

В исследовании содержатся реагенты для сокращения воздействия НАМА или гетерофильных антител. Однако, слишком высокая линейная плотность НАМА или гетерофильных антител может повлиять на результаты исследования.

10.2 Влияние наркотических веществ

У курящих наблюдается повышенный уровень СЕА (см. «Ожидаемые Значения»).

10.3 «Хук-эффект»

«Хук-эффект» был обнаружен в данном исследовании с концентрацией 10,000 нг/мл.

11. ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться в точном соответствии инструкциям производителя. Более того, пользователь должен строго придерживаться правил НЛП (надлежащей лабораторной практики), Это особенно важно при использовании контрольных реагентов. Важно всегда включать соответствующее количество контролей при тестировании для подтверждения соответствия и точности теста. Результаты теста действительны только, если все контроли находятся в указанных диапазонах, и если все другие параметры теста также в указанных диапазонах. В случае, когда Вы сомневаетесь, обратитесь к производителю.

11.2 Терапевтические результаты

Терапевтические результаты не должны основываться только на лабораторных данных, даже если все результаты теста соответствуют значениям, указанным в п.11.1. Любой лабораторный результат является только частью клинической картины.

Диагностика инфекционного заболевания не должна основываться на результатах только одного теста. Точный диагноз должен быть поставлен с учетом истории болезни, симптоматики и серологических данных.

Только результаты теста не могут быть основой для терапевтических заключений.

11.3 Ответственность

Любая модификация тестового набора и/или замена или перемена любых компонентов тестового набора могут отрицательно повлиять на результаты теста. Такие действия не дадут права на замену набора.

Любые претензии, связанные с неверной интерпретацией лабораторных результатов, также недействительны. Производитель не несет ответственности за повреждения во время транспортировки.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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