

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (СЕА)

EIA-1871, СЕА ELISA

Каталог. № : EIA-1871
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 20-08-2012
Версия 6.0



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.

2. ВСТУПЛЕНИЕ

Раково-эмбриональный антиген (СЕА) - это клеточно-поверхностный 200 кд гликопротеин. В 1969 г. было исследовано, что плазма СЕА увеличивалась у 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 изучения 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.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG СЕА ELISA базируется на принципе твердофазового ферментно-связывающего иммуносорбентного теста. Система набора использует моноклональные антитела, направленные против интактных СЕА молекул для иммобилизации на твердой фазе (луночки планшетки). Козье анти-СЕА антитело конъюгировано с пероксидазой (HRPO) и содержится в растворе антитело-ферментного конъюгата. Образец, который тестируется, дает возможность реагировать одновременно с двумя антителами, результат в СЕА молекулах будет разделен между твердофазными и ферментными антителами. После одного часа инкубации при комнатной температуре луночки промываются для удаления несвязанного антигена. Добавляется раствор ТМВ и инкубируется 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.

4. РЕАГЕНТЫ

А. Поставляемые материалы

1. **Планшет** на 96 лунок
2. **Набор Стандартов** (1.0 мл/флакон)
Содержат 0, 3, 12, 30, 60 и 120 нг/мл СЕА в бычьей сыворотке с консервантами.
3. **Ферментный конъюгат** (13 мл)
Содержит козий анти-СЕА конъюгированный с пероксидазой хрена с консервантами
4. **ТМВ реагент** (11 мл)
Содержит ТМВ, стабилизированный в буферном растворе
5. **Стоп раствор 1N HCl** (11 мл)
Разведенная соляная кислота

В. Необходимые, но не поставляемые материалы

- Точные пипетки на 50, 100 мкл и 1 мл
- Сменные наконечники к пипеткам
- Дистиллированная вода
- Вортекс
- Абсорбирующая бумага
- Микропланшетный ридер

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ НАБОРА

1. 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
2. Микропланшет должен храниться при 2 – 8°C. После вскрытия фольгированного пакета при хранении пакет необходимо держать плотно закрытым.

6. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. **ОСТОРОЖНО:** Набор содержит материалы человеческого происхождения, которые были протестированы утвержденными методами и дали отрицательные результаты с ВИЧ 1/2, HBsAg и HCV. Со всеми реагентами обращаться как с потенциально опасными.
2. Избегать контакта с 1N HCl. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги. В случае возможного контакта промыть с достаточным количеством воды и обратиться за медицинской помощью.
3. Не использовать реагенты после истечения срока годности не использовать реагенты из наборов с разными датами партий.
4. Немедленно закрыть флаконы с реагентами после использования. Не менять крышки.
5. Не пипетировать ртом.
6. Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике.

7. ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Для измерения плотности подходит микропланшетный считыватель с шириной световой дорожки 10 нм и оптической плотностью в диапазоне 0-3 OD или выше при длине волны 450 нм.

8. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. В данном исследовании должна использоваться СЫВОРОТКА.
2. Провести забор крови с использованием стандартных методов венопункции. Отделить сыворотку в течение 60 минут после забора.
3. Образцы, которые не тестируются в течение 24 часов после забора, заморозить при -20 °C или ниже. Эти образцы стабильны до 6 месяцев.
4. Не рекомендуется использовать гемолитические (ярко красные), липемические (молочные) или мутные образцы (после центрифугирования).
5. Не допускать многократного замораживания-оттаивания образцов перед анализом. НЕ ХРАНИТЬ образцы в морозильных камерах с функцией саморазмораживания, что может привести к случайным оттаиваниям образца. Образцы, которые замораживались, или мутные образцы необходимо центрифугировать перед использованием.

9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Рекомендации по пипетированию (одиночное и многоканальное). Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно быть завершено в течение 3 минут.
2. Все стандарты, образцы и контроли тестировать в дублях для сохранения одинаковых условий тестирования.
3. Считать результаты на протяжении 15 минут после добавления стоп раствора.

10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед использованием необходимо привести все реагенты к комнатной температуре (18-25 °C).

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Закрепите требуемое количество микротитровальных лунок в держателе.
2. Пипеткой внесите **50 мкл** стандартов, образцов и контролей в соответствующие луночки планшета.
3. Добавьте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте на протяжении **30 сек.** Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
5. Инкубируйте в течение **60 минут** при комнатной температуре (18-25°C).
6. Вытряхните содержимое лунок.
7. Промойте дистиллированной или деионизированной водой **5 раз.** (Не использовать воду из-под крана).
8. Резко встряхните планшет над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.
9. Добавьте **100 мкл** ТМВ реагента в каждую лунку. Осторожно перемешать в течение 10 секунд.
10. Инкубируйте **20 минут** при комнатной температуре (18-25°C).
11. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
12. Осторожно перемешать в течение 30 секунд. **Очень важно, чтобы синий цвет полностью изменился на желтый.**

13. Измерьте оптическую плотность ячеек при **450 нм** в течение **15 минут** после добавления стоп раствора.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Надлежащей лабораторной практике рекомендуется использовать контрольные образцы (контроли) с каждой калибровочной кривой для проверки работы теста. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения надежности результатов. Применяйте соответствующие статистические методы для исследования контрольных значений и отклонений.

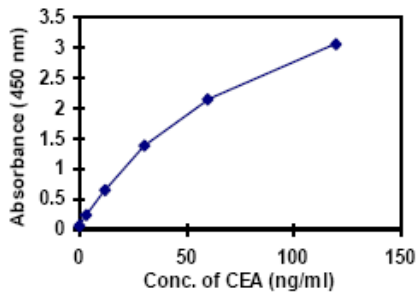
13. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Подсчитать средние значения оптической плотности для каждого набора стандартов, контролей и образцов пациента.
- 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).
- Используя среднее значение каждого образца определить соответствующую концентрацию в нг/мл из стандартной кривой.
- Концентрацию образцов можно считать с этой стандартной кривой. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимания фактор разведения.

14. ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

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

СЕА (нг/мл)	Оптические Единицы (450 нм)
0	0.057
3	0.235
12	0.637
30	1.388
60	2.144
120	3.050



15. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Полное исследование было проведено с использованием 35,000 образцов от более, чем 10,000 пациентов, и контролей. Из 1425 нормальных не курящих пациентов 98.7 % имели значения, меньше 5.0 нг/мл.

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные значения.

16. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Аккуратность

Статистическое исследование с использованием образцов пациентов продемонстрировало хорошую корреляцию результатов с коммерчески доступными наборами, как показано ниже:

N = 68

Коэффициент корреляции = 0.971

Уклон = 0.883

Задержка = 0.034

Среднее EIA-1871 = 10 нг/мл

Среднее Abbot AxSym = 9 нг/мл

В. Чувствительность

Минимально детектируемая концентрация составляет 1.0 нг/мл.

С. Точность

1. Точность внутри анализа

Точность внутри анализа определялась повторным тестированием 4 разных контрольных сывороток в одном анализе.

Образец сыворотки	1	2	3	4
Кол-во повторов	24	24	24	24
Среднее СЕА (нг/мл)	6	23	58	120
Стандартное отклонение	0.2	0.6	1.3	1.7
Коэффициент вариации, %	3.3	2.7	2.2	1.4

2. Точность между анализами

Точность между анализами определялась повторным тестированием 4 разных контрольных сывороток в нескольких различных анализах.

Образец сыворотки	1	2	3	4
Кол-во повторов	32	32	32	32
Среднее СЕА (нг/мл)	7	24	59	129
Стандартное отклонение	0.6	0.6	1.6	4.7
Коэффициент вариации, %	9.7	2.5	2.8	3.7

D. Восстановление и Линейность

1. Восстановление

Разные образцы сыворотки пациентов с определенными уровнями СЕА были перемешаны и тестировались в дублях. Среднее значение составило 95.9 %.

	Ожидаемая концентрация (нг/мл)	Полученная концентрация (нг/мл)	% Восстановления
1.	56.5	54.1	95.9
2.	38.9	39.1	100.7
3.	24.2	24.4	100.9
4.	17.4	15.7	90.2
5.	11.4	10.9	95.7
6.	12.4	11.4	92.0
			Среднее значение = 95.9 %

2. Линейность

Три образца пациента были серийно разбавлены с 0 Стандартом. Среднее значение составило 97.2 %.

№	Разведение	Ожидаемая концентрация (нг/мл)	Полученная концентрация (нг/мл)	% Восстановления
1.	Неразведенный	---	81.8	---
	1:2	42.6	44.2	108.7
	1:4	20.3	21.9	107.7
	1:8	10.2	10.6	104.0
	1:16	5.1	4.6	90.5
	1:32	2.5	1.9	76.1
				Среднее = 97.4 %
2.	Неразведенный	---	122.4	---
	1:2	61.2	61.9	110.1
	1:4	30.6	30.6	99.9
	1:8	15.3	15.1	98.7
	1:16	7.6	6.1	80.2
	1:32	3.8	3.1	80.4
3.	Неразведенный	---	135.3	---
	1:2	61.1	61.1	100.0
	1:4	30.6	29.7	97.2
	1:8	15.3	15.0	98.2
	1:16	7.6	7.4	96.9
	1:32	3.8	3.6	94.8
				Среднее = 97.4 %
4.	Неразведенный	---	45.5	---
	1:2	22.6	24.1	106.1
	1:4	11.4	11.3	99.5
	1:8	5.7	5.8	102.3
	1:16	2.8	3.1	108.3
	1:32	1.4	1.3	93.0
				Среднее = 101.8 %

E. Специфичность

Следующие вещества были тестированы на перекрестную реактивность:

Тестируемый анализ	Концентрация	Полученный Эквивалент к СЕА (нг/мл)
AFP	5,000 нг/мл	0
	10,000 нг/мл	0
	25,000 нг/мл	0
	50,000 нг/мл	0
hCG	5,000 мЕд/мл	0
	10,000 мЕд/мл	0
	50,000 мЕд/мл	0
	100,000 мЕд/мл	0
	250,000 мЕд/мл	0
	500,000 мЕд/мл	0
PAP	1,000 нг/мл	0
	2,500 нг/мл	0
	5,000 нг/мл	0
	10,000 нг/мл	0

PSA	1,000 нг/мл	0
	2,500 нг/мл	0
	5,000 нг/мл	0
CA 125	1,000 Ед/мл	0
	2,500 Ед/мл	1.3
	5,000 Ед/мл	2.6
	10,000 Ед/мл	8.6

F. Hook Effect

Не наблюдался при концентрациях СЕА до 40,000 нг/мл.

17. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Тест должен проводиться в точном соответствии инструкциям производителя. Более того, пользователь должен строго придерживаться правил НЛП (надлежащей лабораторной практики), Процедура промывания является очень важной. Недостаточная промывка приведет к низким результатам точности и ложно завышенным результатам плотности.

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



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