

Набор ИФА для определения РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (CEA)

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

Методика от 04-2012

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

НАЗНАЧЕНИЕ

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

ВСТУПЛЕНИЕ

Раково-эмбриональный антиген (CEA) это клеточно поверхностный 200 кд гликопротеин. В 1969 г. было исследовано, что плазма CEA увеличивалась в 35 из 36 пациентов с раком ободочной кишки и CEA 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 CEA растет при разных формах рака. Рост уровня CEA 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 CEA зависит от стадии и степени болезни, дифференциации опухоли и размеров метастазы. CEA также обнаружено в нормальных тканях.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG CEA ELISA базируется на принципе твердофазового ферментно связанного иммуносорбентного теста. Система набора использует моноклональные антитела, направленные против интактных CEA молекул для иммобилизации на твердой фазе (лунки планшетки). Козлиное анти-CEA антитело конъюгировано с пероксидазой (HRPO) и содержится в растворе антитело-ферментного конъюгата. Образец тесту дает возможность реагировать одновременно с двумя антителами, результат в CEA молекулах будет разделенный между твердофазовыми и ферментными антителами. После одного часа инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанного антигена. Добавляется раствор ТМВ 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 CEA прямо пропорциональна интенсивности цвета образца. Абсорбция измеряется на фотометре при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

1. **Планшетка** на 96 лунок
2. **Стандарты 0**, содержащий 3 мл BND/MIT как консервант.
3. **Стандарты 1-5**, содержащие 5, 10, 25, 50 и 100 содержащий 3 мл BND/MIT как консервант.
4. **Контроль**, 1 флакон (лиофилизированный), 1,0 мл (см. «Приготовление Реагентов»).
5. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 14 мл. Готовый к использованию.
6. **ТМВ-реагент**, 1 флакон, 14 мл. Готовый к использованию.
7. **Стоп раствор**, 1 флакон, 14 мл. Готовый к использованию. Содержит 0,5 M H₂SO₄.
8. **Промывочный Раствор**, 1 флакон, 30 мл (40x концентрированный), см. «Приготовление Реагентов».

Необходимые, но не поставляемые материалы.

- пипетки на 0,05, 0,1, и 1,0 мл;
- сменные наконечники к пипеткам;
- дистиллированная вода;
- вортекс;
- абсорбирующая бумага;
- микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм (± 10 нм).

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.

Сыворотка должна быть приготовлена с цельной крови, собранной приемлемой медицинской технологией. Набор должен быть использован для сывороточных образцов без примесей.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Невыскранные наборы должны храниться при 2-8° С в запечатанном виде вместе с дессикантом. Открытые наборы останутся стабильными до окончания даты годности. Можно использовать фотометр, пригодный для чтения при 450 нм ± 10 нм.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием все реагенты должны быть приведены к комнатной температуре.
2. Разбавьте лиофилизованные стандарты 1,0 мл дистиллированной воды. Оставьте их на 20 минут и мягко смешайте. Разбавленные стандарты останутся стабильными 30 дней при 2-8° С.
3. **Для предотвращения побочного эффекта, образцы с ожидаемой концентрацией CEA выше 9000 нг/мл могут быть определены при 100-кратном разбавлении (т.е. 0,01 мл до 1,0 мл) CEA-несодержащей сывороткой.**

ОБРАЗЕЦ

В данном исследовании может использоваться сыворотка. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

4.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре.

4.2 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.

4.3 Разведение образцов

Если в исходном исследовании образец сыворотки содержит стандарт, превышающий самое высокое значение, образцы могут быть разведены 10-кратно или 100-кратно с веществом для разведения образцов и повторно исследованы согласно пункту Процедура анализа.

Для подсчета концентраций необходимо учитывать данный фактор разведения.

Например:

- a) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотка + 90 мкл Раствор для разведения образцов (тщательно смешать)
- b) разведение 1:100: 10 мкл разведение a) 1:10 + 90 мкл Раствор для разведения образцов (тщательно смешать)

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

5.1 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

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** стандартов, образцов и контролей **новыми одноразовыми наконечниками** в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте на протяжении **10 сек.** Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.

5. Инкубируйте течение **60 минут** при комнатной температуре (18-25°C), не накрывая планшет.
6. Вытряхните содержимое лунок.
7. 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!

8. Добавьте **100 мкл** ТМВ-реагента в каждую лунку.
9. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре (18-25°C).
10. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
11. Измерьте оптическую плотность ячеек при **450 нм** в течении **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. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимания этот фактор разведения.
- Стандартная кривая с CEA ELISA (См. на стр. 5 в оригинале инструкции на англ. языке).

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).

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕДУРЫ

Динамический диапазон исследования

Диапазон исследования 0 – 100 нг/мл.

Аналитическая чувствительность

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

Точность

Вариация внутри анализа – 3,2% - 4,8%.

Вариация между анализами – 4,0% - 6,5%.

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.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

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.

Влияние наркотических веществ

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

9.3 «Хук-эффект»

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

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).