

**СА 19-9****ИН ВИТРО ЕНЗИМЕН ИМУНОЛОГИЧЕН ТЕСТ ЗА КОЛИЧЕСТВЕННО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА АНТИГЕН СА 19-9 В СЕРУМ.****ВЪВЕДЕНИЕ**

Група гликопротеини, наречени SLA, като CA19-9 и CA19-5 се приемат като антигени, свързани с гастроинтестиналния рак.

СА 19-9 представлява най-важният и основен въглехидратен туморен маркер. Имунехистологичното разпределение на СА19-9 в тъканите съответства на количественото изследване на концентрациите на СА19-9 при рак и при нормални и възпалени тъкани. Новите изследвания сочат, че серумното ниво на СА19-9 често е повишено в серумите на пациенти с различни форми на злокачествени гастроинтестинални заболявания като карциноми на панкреаса, дебелото черво и ректума, стомаха и черния дроб. Заедно с СЕА повишено ниво на СА 19-9 подсказва неоплазма на жлъчния мехур в началото на възпалително заболяване на жлъчния мехур. Този антиген може да бъде повишен и при някои незлокачествени заболявания. Проучванията показват, че серумните стойности на СА19-9 са полезни за проследяване на състоянието на пациенти с гореспоменатите злокачествени заболявания. Посочва се, че постоянно повишените стойности в серума на СА 19-9 след проведено лечение могат да служат като индикатор за наличие на окултни метастази и/или остатъчно заболяване. Постоянно повишаващи се стойности на СА19-9 в серума могат да се свържат с прогресивно злокачествено заболяване и лош ефект от провежданата терапия. Понижаващи се стойности на СА19-9 могат да подсказват благоприятна прогноза и положителен ефект от прилаганото лечение.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Концентрацията на СА 19-9 е право пропорционална на наситеността на получения при реакцията цвят на пробата. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично при 450 nm.

РЕАГЕНТИ

1. Anti-CA 19-9 coated microtiter plate, 96 wells
2. Assay Buffer, 13 ml
3. Enzyme Conjugate Concentrate (12x), 1.1 ml
4. CA 19-9 Conjugate Diluent, 13 ml
5. CA 19-9 Ref. Standards: 0, 25, 75, 150, 300 and 600 U/ml течни, готови
6. TMB Reagent, готов, 11 ml
7. Stop Solution (1N HCl), 11 ml.
8. Wash Buffer Concentrate (20x), 50 ml

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА ТЕСТА

Неотворените тестове трябва да се съхраняват при 2-8°C в затворената си опаковка с торбички поглъщащи влагата, за да се сведе до минимум излагането на влажен въздух. Отворените тестове остават стабилни до изтичане на срока на годност, ако се съхраняват както е описано по-горе. Тестовите могат да се използват на апарат с ширина на честотната лента 10 nm или по-малка, оптична плътност 0-2 OD или повече при 450 nm дължина на вълната.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Трябва да се използва серум, приготвен от пълна кръв, посредством стандартните лабораторни процедури. Тестът може да се използва само със серум, в който няма добавки.

ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТИТЕ

1. Всички реагенти трябва да се поставят при стайна температура (18-25 °C) преди употреба.
2. Смесете 1 част от Wash Buffer Concentrate (20x) и 19 части дестилирана вода. Например разреждете 50 ml Wash Buffer Concentrate (20x) в 950 ml дестилирана вода, за да получите 1000 ml Wash Buffer (1x). *Този миеш буфер е стабилен 1 месец при 2-8°C. Преди употреба разклатете добре. Ако са се образували кристали, те трябва да се разтворят на стайна температура преди да се направи разреждането.*
3. За да пригответе работния CA 19-9 Conjugate Reagent:
 - За 3.0 ml, което е повече от достатъчно за 24 ямки:
Добавете 0.25 ml Enzyme Conjugate Concentrate (12x) към 2.75 ml от Enzyme Conjugate Diluent (разреждане 1:11) и размесете добре.
 - За 6 ml, което е повече от достатъчно за 48 ямки:
Добавете 0.5 ml Enzyme Conjugate Concentrate (12x) към 5.5 ml от Conjugate Diluent (разреждане 1:11) и размесете добре.
 - За 9 ml, което е повече от достатъчно за 72 ямки:
Добавете 0.75 ml Enzyme Conjugate Concentrate (12x) към 8.25 ml от Conjugate Diluent (разреждане 1:11) и размесете добре.
 - За 12 ml, което е повече от достатъчно за 96 ямки:
Добавете 1.0 ml Enzyme Conjugate Concentrate (12x) към 11 ml от Conjugate Diluent (разреждане 1:11) и размесете добре.

Работният реагент трябва да се приготвя всеки път непосредствено преди използването му. Количеството приготвен реагент зависи от броя на пробите.

Изхвърлете остатъка от работния реагент след като приключите работата за деня.

ПРОЦЕДУРА

1. Поставете желания брой ямки в носача.
2. Пипетирайте 10 μ l от стандартите, пробите и контролите в съответните ямки.
3. Пипетирайте 100 μ l от Assay Buffer (зеления разтвор) във всяка ямка.
4. Размесете добре в продължение на 30 секунди. Доброто размесване е много важно.
5. Инкубирайте при 37 °C 90 минути.
6. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с ямките в контейнер за отпадъци.
7. Измийте ямките 5 пъти с приготвения Wash Buffer (1x).
8. Изступайте рязко ямките върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки вода.
9. Пипетирайте 100 μ l от приготвения работен Enzyme Conjugate Reagent (червеният разтвор) във всяка ямка. Размесете добре 30 секунди.
10. Инкубирайте при 37 °C 90 минути.
11. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с ямките в контейнер за отпадъци.
12. Измийте ямките 5 пъти с приготвения Wash Buffer (1x).
13. Изступайте рязко ямките върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки вода.
14. Пипетирайте 100 μ l от TMB реагента във всяка ямка. Леко размесете 10 секунди.
15. Инкубирайте при стайна температура на тъмно 20 минути без да разклатяте.
16. Спрете реакцията като добавите 100 μ l Stop Solution във всяка ямка.
17. Леко размесете 30 секунди. *Много е важно синият цвят напълно да се превърне в жълт.*
18. Отчетете абсорбцията при 450 nm с ELISA апарат до 15 минути.

ИЗЧИСЛЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средната абсорбция (A_{450}) за всеки комплект стандарти, контроли и проби на пациенти.
2. Конструирайте стандартна крива въз основа на абсорбцията на всеки референтен стандарт.
3. Използвайте средната стойност на абсорбцията за всяка проба, за да определите съответната концентрация на СА 19-9 в U/ml от стандартната крива.

ПРИМЕР ЗА СТАНДАРТНА КРИВА

Дадената като пример стандартна крива може да служи само като илюстрация и не трябва да се използва при изчисление на неизвестни проби. Всяка лаборатория трябва да получи свои собствени данни и стандартна крива.

СА 19-9 (U/ml)	Абсорбция (450nm)
0	0.075
25	0.373
75	0.900
150	1.543
300	2.237
600	2.832

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ НА ТЕСТА

< 35 U/ml Всяка лаборатория трябва да установи свой собствен диапазон от очаквани стойности. Минималната концентрация на СА 19-9, която този тест може да открие, е 5 U/ml.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕСТА

1. Надеждни и възпроизводими резултати могат да се постигнат само ако описаната процедура се разбира напълно и спазва точно.
2. Както при всички подобни тестове неправилно извършено миене може да причини неточни и невъзпроизводими резултати.
3. Серумни проби, които са силно липемични, силно хемолизирани или мътни не трябва да се тестват с тази процедура.
4. Резултатите от този тест трябва да се използват само в съвкупност с другите диагностични процедури и информация, известна на лекаря.

Rev:010912

Производител: BioCheck Inc., 323 Vintage Park Drive, Foster City, CA94404, USA**Вносител:** "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1