

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА (СЕА)

## EIA-1871, SEA 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 SEA ELISA базируется на принципе твердофазового ферментно-связывающего иммуносорбентного теста. Система набора использует моноклональные антитела, направленные против интактных СЕА молекул для иммобилизации на твердой фазе (лунки 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 лунки 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 лунки 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.

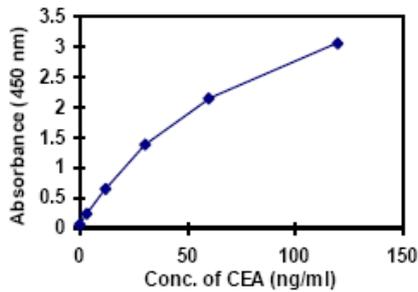
## 13. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 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 %

### Е. 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

<b>PSA</b>	1,000 нг/мл	0
	2,500 нг/мл	0
	5,000 нг/мл	0
<b>CA 125</b>	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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)