

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ CYFRA 21-1

EIA-5070, TM-CYFRA 21-1 ELISA

Кат. № : EIA-5070
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 07-2011
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. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Назначение использования

Набор DRG TM-CYFRA 21-1 ИФА разработан для количественного in-vitro определения CYFRA 21-1 в сыворотке и плазме с гепарином.

1.2 Общие сведения

CYFRA 21-1 – это фрагмент Цитокератина 19. Несмотря на то, что этот фрагмент присутствует во всех тканях тела, основное его количество находится в легких, а особенно в опухолевой ткани легких. Главное диагностическое значение CYFRA 21-1 как онкомаркера – дифференциальная диагностика, прогноз и реабилитация пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМРЛ). К тому же CYFRA 21-1 может выступать как онкомаркер при мониторинге рака пузыря.

Набор DRG® CYFRA 21-1 ELISA использует два вида моноклональных мышиных антител KS19.1 и BM19.21 для определения Цитокератина 19.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Метод основан на последовательном взаимодействии иммобилизованных и меченных пероксидазой антител с молекулами онкомаркера CYFRA 21-1 на твердой фазе, отмывки не связавшихся компонентов и количественной его оценки по интенсивности окрашивания раствора субстрата. Величину абсорбции измеряют после остановки реакции на основной: 450 нм и референсной: 620 нм длинах волн планшетного спектрофотометра.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор предназначен только для использования в in-Vitro диагностике. Только для профессионального использования.
2. 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.
3. Перед началом анализа полностью и внимательно прочитать инструкции. Использовать действующую версию инструкции, поставляемой с набором. Убедиться, что все понятно.
4. Микропланшет состоит из отделяющихся полосок. Неиспользованные лунки должны храниться при 2-8 °C в запечатанной упаковке и должны использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно проводиться как можно быстрее и с одинаковыми промежутками для каждого шага.
6. 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.
7. Для получения надлежащих результатов, тщательно перемешивать содержимое лунок. Не использовать лунки повторно.
8. Не допускать высушивания лунок в процессе тестирования; добавлять реагенты немедленно после завершения шага промывки.
9. 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.
10. Не пипетировать ртом. Избегать контакта с кожей и слизистой.

11. Не употреблять пищу, не пить и не пользоваться косметикой в области работы с реагентами.
12. При работе с образцами и реагентами использовать одноразовые перчатки. Микробное загрязнение реагентов или образцов может привести к ложным результатам.
13. Обращаться с реагентами в соответствии с установленными нормами.
14. Не использовать после окончания срока годности.
15. Соблюдать все указанные объемы. Оптимальные результаты возможны только при использовании калиброванных пипеток и считывающего устройства микропланшета.
16. Не смешивать компоненты из разных наборов и партий.
17. Избегать контакта со стоп-раствором, содержащим 0.5 M H₂SO₄. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Proclin 300, BND и/или MIT в качестве консервантов. В случае контакта с глазами или кожей, немедленно промыть водой.
19. 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.
20. Химикаты и приготовленные или использованные реагенты уничтожать в соответствии с установленными правилами.
21. За дополнительной информацией обратиться к производителю.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Поставляемые реагенты

1. **Микротитровальный планшет** 12x8 (делимые) стрипов, всего вмещает 96 лунок.
Лунки покрыты анти-CYFRA 21-1 моноклональным антителом
2. **Стандарты (0-4)**, 5 флаконов (в лиофилизированном виде), 1.0 мл,
Концентрации: 0, 3, 10, 25, 50 нг/мл
См. «Подготовка реагентов»; содержит консервант без ртути
3. **Контроли Низкий и Высокий**, 2 флакона (в лиофилизированном виде), 1.0 мл каждый см. «Подготовка реагентов». Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетке флакона или в сертификате качества. Содержит консервант без ртути.
4. **Раствор для разведения образцов**, 1 флакон, 3 мл, готов к использованию. Содержит консервант без ртути.
5. **Буфер для анализа**, 1 флакон, 7 мл, готов к использованию. Содержит консервант без ртути.
6. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 1,2 мл, готов к использованию, анти-CYFRA 21-1 антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Содержит консервант без ртути.
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию. Содержит 0,5 M H₂SO₄. Избегать контакта со стоп раствором. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
9. **40X концентрат промывочного буфера**, 1 флакон, 30 мл. См. „Подготовка реагентов“.

Внимание: Дополнительный раствор для разведения образцов предоставляется по требованию.

4.2 Необходимые материалы, не поставляемые с набором

- Микропланшетный калиброванный ридер (450 ± 10 нм) (например, Микропланшетный Ридер пр-ва DRG Instruments).
- Калибровочные микропипетки.
- Промокательная бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Таймер.
- Диаграммная бумага или программное обеспечение для обработки данных.

4.3 Условия хранения

При хранении при температуре 2 – 8 °C реагенты сохраняют реактивность до истечения срока годности. Не рекомендуется использовать реагенты после истечения срока годности. Все открытые реагенты необходимо хранить при температуре 2 – 8 °C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2 – 8 °C. Сразу после вскрытия фольгированного пакета его необходимо аккуратно запечатать.

Внимание: Восстановленные стандарты и контроли стабильны, по меньшей мере, 4 недели при 2 – 8 °C. При более длительном хранении заморозить до – 20 °C.

4.4 Подготовка реагентов

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

Стандарты

Восстановить лиофилизированное содержимое флакона стандарта 1 мл дистиллированной воды.

Внимание: Восстановленные стандарты и контроли стабильны, по меньшей мере, 4 недели при 2 – 8 °С. При более длительном хранении заморозить до – 20 °С.

Контроль

Восстановить лиофилизированное содержимое с 1.0 мл дистиллированной воды и дать отстояться в течение 10 минут. Перед использованием перемешать контроль несколько раз.

Внимание: Восстановленный контроль стабилен, по меньшей мере, 4 недели при 2 – 8 °С. При более длительном хранении заморозить до – 20 °С.

Промывочный раствор

Добавить деионизированную воду к 40X концентрированному промывочному раствору.

Развести 30 мл концентрированного промывочного буфера деионизированной водой (1170 мл) до конечного объема 1200 мл.

Внимание: Разведенный промывочный раствор сохраняет свою стабильность в течение 2 недель при комнатной температуре.

4.5 Утилизация набора после использования

Утилизацию набора необходимо проводить в соответствии с правилами национальной безопасности. Вся необходимая информация о данном продукте приводится в паспорте безопасности данных.

4.6 Поврежденные наборы

В случае сильного повреждения набора или его компонентов, необходимо в письменной форме уведомить об этом компанию DRG не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не рекомендуются использовать в проведении анализа. Их необходимо хранить до принятия окончательного решения, после чего, ликвидировать в соответствии с официальными правилами.

5. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В этом анализе можно использовать сыворотку или гепаринизированную плазму. Результаты цитратной плазмы в заниженных значениях и ЭДТК – в очень повышенных значениях.

Не подходят для тестирования гемолизированные, желтушные или липоидные образцы.

Примечание: Не следует также использовать сыворотки, содержащие азид натрия.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Собрать кровь венопункцией в специальные контейнеры (например: Sarstedt Monovette # 02.1388.001). Дать крови отстояться при комнатной температуре до образования кровяного сгустка, отцентрифугировать ее и слить сыворотку. Образцы крови пациентов, подвергшихся накануне антикоагулянтной терапии, должны выстаиваться дольше.

Плазма:

Образцы цельной крови необходимо поместить в центрифужные пробирки с антикоагулянтами и отцентрифугировать сразу же после их отбора.

(для гепариновой плазмы использовать Sarstedt Monovette – оранжевый колпачок - # 02.165.001)

5.2 Подготовка и хранение образцов

Контейнеры с образцами можно хранить до проведения анализа в течение 2 дней при температуре 2 - 8 °С. Для более длительного хранения (до 1 года) их необходимо заморозить до -20 °С. Оттаянные образцы должны быть инвертированы несколько раз перед тестированием.

5.3 Разведение образцов

Протестированные образцы, показавшие значения абсорбции выше максимального стандарта, необходимо развести в 10 или 100 раз раствора для разведения образцов и протестировать заново.

Для подсчета концентрации должен учитываться фактор разведения.

Например:

а) разведение 1:10: 10 мкл Сыворотки + 90 мкл раствора для разведения образцов (тщательно перемешать)

б) разведение 1:100: 10 мкл раствор а) 1:10 + 90 мкл раствора для разведения образцов (тщательно перемешать)

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

Каждый анализ должен иметь стандартную кривую.

1. Установите необходимое количество микротитровальных лунок в рамку-держателя.
2. Внести в каждую лунку по **50 мкл** буфера для анализа.
3. Добавить по **10 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Внести по **50 мкл** каждого стандарта, контроля и образцов новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. Тщательное перемешивание очень важно в данном этапе.
5. Инкубировать в течение **60 минут** при комнатной температуре, не накрывая планшету.
6. Вытряхнуть содержимое лунок в раковину. Промыть лунки **3 раза** разведенным промывочным раствором (по 350 мкл на каждую лунку). Выступать остатки капель из лунок на толстом слое фильтровальной бумаге.
Важно: Чувствительность и точность данного анализа значительно зависит от точного проведения процедуры промывки!
7. Внести по **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
8. Инкубировать в течение **15 минут** при комнатной температуре.
9. Остановить реакцию, добавив по **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
10. **В течение 10 минут** после остановки реакции измерить оптическую плотность на длине волны **450 ± 10 нм** микропланшетного спектрофотометра.

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 параметровая логистика) 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 должны быть указаны как > 50 нг/мл. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимание фактор разведения.

6.3.1 Пример типичной стандартной кривой

Представленные ниже значения оптических плотностей протестированных стандартов приведены лишь в качестве иллюстрации и не должны подменять собой конкретных результатов ИФА, получаемых в каждой лаборатории самостоятельно.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	0,05
Стандарт 1 (3 нг/мл)	0,23
Стандарт 2 (10 нг/мл)	0,63
Стандарт 3 (25 нг/мл)	1,37
Стандарт 4 (50 нг/мл)	2,35

7. ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные уровни и отклоняющиеся от нормы величины. Все участвующие в исследовании, проводившемся с

использованием DRG® CYFRA 21-1 ELISA, показавшие результаты абсорбции в пределах нормального диапазона были признаны условно здоровыми. В итоге проведенных изысканий были получены следующие данные:

Население	Кол-во испытуемых	5% процентиль	95% процентиль
Мужчины и женщины	35	0,74 нг/мл	2,74 нг/мл

Согласно данным ряда исследований порог Cut-off рекомендуется устанавливать для CYFRA 21-1 на уровне 3,3 нг / мл, так как при тестировании здоровых людей и 95% больных с доброкачественными заболеваниями легких обычно отмечаются более низкие значения (1,2,3).

Полученные результаты ИФА следует обязательно сопоставлять с данными других диагностических методов, т.к. сами по себе они не могут служить достаточным основанием для назначения протестированным пациентам тех или иных терапевтических процедур

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 0,15 – 50 нг/мл.

9.2 Специфичность антител (Перекрестная реактивность)

Никаких перекрестных реакций не было отмечено при тестировании этим набором реагентов других онкомаркеров: CA 15-3, CA 19-9, CA 125, CA 72-4.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность, рассчитанная по среднему значению оптической плотности 20 протестированных проб нулевого стандарта и трех стандартных отклонений от этой величины, была определена на уровне 0.15 нг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Внутренняя точность тестирования

Внутренняя вариабельность данных приведена ниже в таблице:

Образец	Кол-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	20	17,2	4,5
2	20	8,3	6,9
3	20	5,2	5,1

9.4.2 Точность тестирования в серии анализов

Данные по вариабельности результатов ИФА представлены ниже:

Образец	Кол-во	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	14	15,4	9,3
2	14	7,9	8,9
3	14	5,0	5,8

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением CYFRA 21-1 растворов с известными концентрациями в отношении 1:1.

% воспроизводимости была подсчитана путем умножения отношения измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Добавленная конц. (нг/мл)	Измеренная конц. (нг/мл)	Ожидаемая конц. (нг/мл)	Воспроизводимость (%)
1	0	19.0		
	50	35.3	34.5	102.3
	25	22.1	22.0	100.4
	10	14.9	14.5	102.7
2	0	11.6		
	50	27.6	30.8	89.6
	25	17.4	18.3	95.1
	10	10.8	10.8	100.0
3	0	7.9		
	50	27.2	29.0	94.0
	25	16.4	16.5	99.7
	10	8.7	9.0	97.2

9.6 Линейность

Образец	Разбавление	Измеренная конц. (нг/мл)	Ожидаемая конц. (нг/мл)	Воспроизводимость (%)
1	нет	22.0	22.0	
	1:2	10.0	11.0	91.1
	1:4	5.9	5.5	106.5
	1:8	3.1	2.8	111.2
	1:16	1.5	1.4	105.9
2	нет	18.7	18.7	
	1:2	9.1	9.3	97.6
	1:4	4.4	4.7	93.6
	1:8	2.5	2.3	107.7
	1:16	1.2	1.2	99.9
3	нет	8.8	8.8	
	1:2	4.1	4.4	94.7
	1:4	2.4	2.2	108.2
	1:8	1.1	1.1	102.7
	1:16	0.6	0.6	112.2

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

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

10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), Билирубин (до 0,5 мг/мл) и Триглицериды (до 30 мг/мл) никак не влияют на результаты исследования.

В исследовании содержатся реагенты для сокращения воздействия Человеческих Анти-мышинных Антител (ЧАМА) или гетерофильных антител. Однако слишком высокая линейная плотность ЧАМА или гетерофильных антител может повлиять на результаты исследования.

10.2 Вмешательство лекарственных препаратов

До сегодняшнего дня не обнаружено никаких веществ – лекарственных препаратов, влияющих на измерение CYFRA 21-1 в образце.

10.3 Эффект крюка

Эффект крюка не был обнаружен в данном исследовании с концентрациями CYFRA 21-1 до 250 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.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com