



Набор ИФА
для количественного определения в
сыворотке или гепариновой плазме
CYFRA 21-1

Кат. № : EIA-3943
Количество : 96
Производитель: DRG (США)

Методика от 11-2008

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

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Предназначение

DRG CYFRA 21-1 ELISA набор является ИФА для количественного определения CYFRA 21-1 *in vitro* в сыворотке и гепариновой плазме.

1.2 Обобщение и объяснение

CYFRA 21-1 - фрагмент цитокератина 19. Хотя он присутствует во всех тканях тела, он наиболее встречается находится в легких, особенно в раковых тканях легких. Главное диагностическое значение CYFRA 21-1 маркерного гена опухоли является в дифференциации диагноза, прогноза, и ухода за пациентами после лечения от не-мелкоклеточного рака легких (NSCLC). К тому же, CYFRA 21-1 описан как маркерный ген опухоли для мониторинга рака мочевого пузыря.

DRG CYFRA 21-1 ELISA использует два мышиных моноклональных антитела KS19.1 и BM19.21, чтобы определить фрагменты цитокератина 19.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

DRG CYFRA 21-1 ELISA набор - твердофазный иммуоферментный анализ твердой фазы (ELISA) основанный на принципе "сэндвича". Лунки на микротитровальном планшете покрыты моноклональным антителом, направленным к уникальной антигенной области на молекуле CYFRA 21-1.

Аликвот образца пациента, содержащий эндогенный CYFRA 21-1 инкубируется на лунке, покрытой ферментным конъюгатом, который является анти-CYFRA 21-1 моноклональным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена. После инкубации несвязанный конъюгат смывается.

Количество связанной пероксидазы пропорционально концентрации CYFRA 21-1 в образце.

При добавлении субстратного раствора интенсивность образовавшегося цвета пропорциональна концентрации CYFRA 21-1 в образце пациента.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Для диагностики *in vitro*.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Используемые сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора, содержащей 0,5 M H₂SO₄. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты при использовании калиброванных пипеток.
- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не

рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.

- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Данные паспорта безопасности доступны по требованию.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микротитровальные лунки**, 12x8 (делимых) полосок, 96 лунок
Лунки, покрыты моноклональным анти-CYFRA 21-1 антителом.
2. **Стандарт (Стандарт 0-4)**, 5 (лиофилизированные) флаконов, 1.0 мл. Концентрации: 0; 3; 10; 25; 50 нг/мл. См. „Подготовка Реагентов“; Содержит 0.03 % Проклина 300, 0,015% BND и 0,010 MIT в качестве консервантов.
3. **Контроль**, 1 (лиофилизированный) флакон, 1.0 мл.
См. „Подготовка Реагентов“.
Значения и диапазоны контролей указаны на этикетке флакона или Листе данных Контроля Качества.
Содержит 0.03 % Проклина 300, 0,015% BND и 0,010 MIT в качестве консервантов.
4. **Разбавитель образца**, 1 флакон, 3 мл, готовый к использованию.
Содержит 0.03 % Проклина 300, 0,015% BND и 0,010 MIT в качестве консервантов.
5. **Концентрат ферментного конъюгата 21X**, 1 флакон, 0.5 мл, анти-CYFRA 21-1 антитело, конъюгированное к пероксидазой хрена.
См. „Подготовка Реагентов“.
Содержит 0.03 % Проклина 300, 0,015% BND и 0,010 MIT в качестве консервантов.
6. **Разбавитель конъюгата**, 1 флакон, 7 мл, готовый к использованию.
Содержит 0.03 % Проклина 300, 0,015% BND и 0,010 MIT в качестве консервантов.
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию, ТМВ.
8. **Стоп раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию.
Содержит 0.5M H₂SO₄.
Избегайте контакта со стоп раствором. Он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
9. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрированный). См. „Подготовка Реагентов“.
*BND = 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан
MIT = 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

Примечание: *Дополнительный разбавитель образцов для разбавления образцов доступен по запросу.*

4.2 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микропланшетный считыватель, способный проводить измерения при 450 нм (± 10 нм).
- Калиброванные дозаторы.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная вода.
- Таймер.
- Полулогарифмическая миллиметровая бумага или ПО для обработки данных.

4.3 Условия хранения

При хранении при 2-8⁰C не вскрытые реагенты будут сохранять свою реактивность до окончания срока годности. Не используйте реагенты после срока годности.

Вскрытые реагенты должны храниться при 2-8⁰C. Микропланшет необходимо хранить при 2-8⁰C. После вскрытия мешочка необходимо следить, чтобы он был снова плотно закрыт.

Примечание: *ресуспендированные стандарты и контроли стабильны по крайней мере 4 недели при 2-8⁰C. При более длительном хранении заморозить до -20⁰C.*

4.4 Приготовление реагентов

Приведите все реагенты и полоски, что будут использоваться, к комнатной температуре.

Стандарты

Ресуспендируйте лиофилизированное содержимое флакона со стандартом 1 мл дистиллированной воды.

Примечание: *ресуспендированные стандарты стабильны по крайней мере 4 недели при 2-8⁰C. При более длительном хранении заморозить до -20⁰C.*

Контроль

Ресуспендируйте лиофилизированный объем 1 мл дистиллированной воды и оставьте минимум на 10 минут. Перед использованием перемешайте контроль несколько раз.

Примечание: *ресуспендированный контроль стабилен по крайней мере 4 недели при 2-8⁰C. При более длительном хранении заморозить до -20⁰C.*

Промывочный раствор

Добавьте неиницированную воду к 40х концентрированному промывочному раствору.

Разбавьте 30 мл концентрированного промывочного раствора с 1170 мл деионизированной воды чтобы достичь окончательный объем 1200 мл.

Разбавленный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

Ферментный конъюгат

Разбавьте концентрат ферментного конъюгата 1:21 в разбавителе конъюгата.

Стабильность подготовленного ферментно-конъюгата: использовать в пределах 24 часов.

Пример:

При использовании целого планшета, разбавьте 300 мкл ферментного конъюгата (21х конц.) 6 мл разбавителя конъюгата к общему объему 6.3 мл.

Если весь планшет не используется, сразу приготовьте требуемое количество ферментного конъюгата путем смешивания 25 мкл ферментного конъюгата (21X конц.) с 0.5 мл разбавителя конъюгата на лунку (см. таблицу ниже):

Кол-во лунок	Ферментный конъюгат 21х конц. (мкл)	Разбавитель конъюгата (мл)
1	25	0,5
2	50	1,0
3	75	1,5
4	100	2,0
5	125	2,5
6	150	3,0
7	175	3,5
8	200	4,0
9	225	4,5
10	250	5,0
11	275	5,5
12	300	6,0

4.5 Уничтожение набора

Уничтожение набора необходимо делать согласно требованиям по безопасности. Специальная информация для данного продукта указана в листе данных по безопасности (см. раздел 13).

4.6 Повреждение набора

При повреждении набора или компонентов, необходимо уведомить производителя в течении 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не должны использоваться в анализе. Их необходимо хранить до получения замены, после чего уничтожить.

5. ОБРАЗЦЫ

В этом анализе необходимо использовать сыворотку или гепариновую плазму.

Цитратная плазма ведет к уменьшенным, EDTA к резко возросшим значениям.

Не используйте гемолитические, желтушные или липемические образцы.

Внимание: образцы, содержащие азид натрия не должны использоваться в анализе.

5.1 Забор образцов**Сыворотка:**

Соберите кровь венепункцией (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дайте возможность сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. Для крови пациентов, проходящих антикоагуляционную терапию, может потребоваться больше времени для свертывания.

Плазма:

Цельная кровь должна быть собрана в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и центрифугировать после забора. (Например, для гепариновой плазмы - Sarstedt Monovette – оранжевая крышка - # 02.165.001).

5.2 Хранение образцов

Образцы должны быть закрытыми и храниться до 2 дней при 2-8°C. Для более длительного периода образцы должны быть заморожены до -20°C и храниться до проведения анализа. Размороженные образцы необходимо перевернуть несколько раз перед анализом.

5.3 Разбавление образцов

Образцы с начальными значениями высшими, чем наивысший стандарт необходимо разбавить разбавителем образца и повторно проанализировать.

Для вычисления концентрации необходимо учесть этот фактор разбавления.

Например:

а) Разбавление 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл разбавителя образца (тщательно перемешайте);

б) Разбавление 1:100: 10 мкл разбавления «1:10» + 90 мкл разбавителя образца (тщательно перемешайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**6.1 Общие замечания**

- Перед использованием выдержите все реагенты при комнатной температуре. Тщательно перемешайте все реагенты и образцы перед использованием, легко переворачивая без образования пены.
- После начала теста все этапы нужно выполнять без перерывов.
- Используйте каждый раз новые пластиковые пипетки для каждого стандарта, образца и контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Приготовьте все необходимое перед началом теста, чтобы не тратить время во время самого теста.
- В основном ферментная реакция является линейно пропорциональной времени и температуре.

6.2 Проведение анализа

Каждая процедура должна включать использование калибровочной кривой.

1. Закрепите необходимое количество микротитровальных лунок в держателе.
2. Внесите **50 мкл** каждого из стандартов, контролей и образцов, используя новые наконечники, в соответствующие лунки.
3. Внесите **50 мкл** только что разбавленного ферментного конъюгата (см. «Приготовление реагентов») в каждую лунку. Тщательно перемешивайте на протяжении 10 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте в течении **30 минут** при комнатной температуре (не накрывая планшет).
5. Вытряхните содержимое лунок. Промойте разведенным промывочным раствором **3 раза** (350 мкл на лунку). Резко вытряхните содержимое лунок над абсорбирующей бумагой, чтобы удалить остатки капель.
Важное замечание:
Чувствительность и точность анализа зависит от правильного исполнения процедуры промывания!
6. Добавьте **100 мкл** раствора субстрата в каждую лунку.
7. Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре.
8. Добавьте **100 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
9. Измерьте оптическую плотность каждой лунки при **450 нм ± 10 нм** в течении **10 минут** после добавления стоп раствора.

6.3. Вычисление результатов

1. Вычислите среднюю абсорбцию для каждого стандарта, контроля и образца.
2. Постройте стандартную кривую откладывая среднюю абсорбцию полученную для каждого стандарта против его концентрации при значении абсорбции на оси У и концентрации на оси Х.
3. Используя значение средней абсорбции для каждого образца, определите соответствующую концентрацию на калибровочной кривой.
4. Автоматические данные, компьютерные программы, кубический сплайн, 4 PL или логарифмический также дают хорошие результаты.
5. Концентрация образцов может считаться со калибровочной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем концентрация наивысшего стандарта необходимо разбавить или отображать как > 50 нг/мл. При вычислении концентрации этот фактор разбавления необходимо учитывать.

6.3.1 Типичный пример калибровочной кривой

Последующие данные используются только в демонстрационных целях и не должны использоваться вместо полученных во время анализа данных:

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 ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ

Настоятельно рекомендуется, что каждая лаборатория установила собственные нормальные и патологические значения.

При изучении очевидно здоровых взрослых, используя данный набор, были получены следующие данные:

Население	Кол-во	5% процентиль	95% процентиль
Мужчины и женщины	71	0,37 нг/мл	2,82 нг/мл

Только отдельно взятые результаты не должны быть единственным основанием для терапевтических заключений. Результаты должны сопоставляться с другими клиническими исследованиями и диагностическими тестированиями.

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Квалифицированная лабораторная практика требует проводить проверку контролей с каждой калибровочной кривой. Для определения средних значений и приемлемых диапазонов для обеспечения правильности процедуры требуется анализ статистически значимого количества контролей.

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствие с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Контроли и соответствующие результаты Лаборатории контроля качества указаны в сертификате контроля качества, который прилагается к набору. Значения и диапазоны, указанные в сертификате контроля качества всегда соответствуют данному лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Диапазон анализа находится между 0,3-50 нг/мл

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Сыворотка здоровых лиц не вступала в реакцию с DRG CYFRA 21-1 ELISA набором.

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была вычислена из среднего плюс двух стандартных отклонений анализов 20 репликатов нулевого стандарта и составила 0,3 нг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Вариативность в анализе

Образец	n	Среднее нг/мл	КВ %
1	20	5,64	1,9
2	20	7,33	1,9
3	20	23,21	2,3

9.4.2 Вариативность между анализами

Образец	n	Среднее нг/мл	КВ %
1	20	5,54	7,6
2	20	8,01	4,8
3	20	13,93	7,4

9.5 Восстановление

Образцы были обогащены добавлением CYFRA 21-1 раствора при известных концентрациях.

% воспроизводимости был вычислен умножением коэффициента измерений и ожидаемых значений на 100.

Образец	Добавленная конц. 1:1 (о/о) (нг/мл)	Измеренная конц. нг/мл	Ожидаемая конц. нг/мл	Извлечение %
1	0.0	5.33		
	2.0	6.95	7.33	94.8
	4.0	9.20	9.33	98.6
	8.0	12.89	13.33	96.7
	16.0	21.27	21.33	99.7
2	0.0	7.75		
	2.0	9.79	9.75	100.4
	4.0	11.89	11.75	101.2
	8.0	14.75	15.75	93.7
	16.0	23.15	23.75	97.5
3	0.0	13.39		
	2.0	14.91	15.39	96.9

	4.0	17.05	17.39	98.0
	8.0	19.57	21.39	91.5
	16.0	28.51	29.39	97.0

9.6 Линейность

Образец	Фактор разведения	Получ. конц., нг/мл	Ожид. конц. (нг/мл)	Воспроизводимость (%)
1	Неразбавл.	9.06	9.06	
	1:2	4.61	4.53	101.9
	1:4	2.21	2.27	97.6
	1:8	1.11	1.13	98.0
	1:16	0.52	0.57	91.8
2	Неразбавл.	15.33	15.33	
	1:2	7.56	7.67	98.6
	1:4	3.78	3.83	98.6
	1:8	1.71	1.92	89.2
	1:16	0.86	0.96	89.8
3	Неразбавл.	30.48	30.48	
	1:2	15.49	15.24	101.6
	1:4	7.15	7.62	93.8
	1:8	3.52	3.81	92.4
	1:16	1.82	1.91	95.6

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Неправильное обращение с образцами или модификация теста может влиять на результаты.

10.1 Влияющие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты анализа.

Анализ содержит реагенты, чтобы минимизировать влияние НАМА и гетерофильных антител. Однако, чрезвычайно высокие титры НАМА или гетерофильных антител могут влиять на результаты анализа.

10.2 Влияние лекарств

До сегодняшнего дня не известны вещества (лекарства), что влияют на результаты анализа.

10.3 «Хук-эффект» высокой дозы

«Хук-эффекта» в данном анализе не наблюдалось до 400 нг/мл CYFRA 21-1.

11. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

11.3 Ответственность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не является под ответственностью производителя.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.com
www.diameb.ua