



## 1 НАЗНАЧЕНИЕ

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

Только для **in vitro** диагностики.

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<sup>®</sup> CYFRA 21-1 ELISA использует два вида моноклональных мышинных 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 референс: 620 нм длинах волн планшетного спектрофотометра.

## 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.
- За более полной информацией об опасных веществах, входящих в состав набора, обращайтесь к паспорту безопасности данных для данного набора.
- Все реагенты данного набора, содержащие сыворотку или плазму человека, были протестированы и определены как отрицательные для ВИЧ (HIV I/II), поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) и ВГС (HCV). Однако все реагенты необходимо рассматривать как потенциальную биологическую угрозу.
- Избегать контакта со стоп раствором, содержащим 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги.
- Не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курить, не пить, не использовать косметику во время работы с образцами и реагентами набора.
- Проводить анализ рекомендуется в одноразовых перчатках. Попадание инфекции в реагенты и образцы может привести к ошибочным результатам.
- Соблюдайте меры предосторожности. Анализ необходимо проводить в соответствии с правилами национальной биологической безопасности.
- Обращайте внимание на номер лота и срок хранения.
- Все указанные значения необходимо выполнять в соответствии с инструкцией набора. Наиболее оптимальных результатов анализа можно достичь путем использования градуированных пипеток.
- Не используйте реагенты из разных наборов. Рекомендуется не смешивать лунки различных планшетов даже из одного лота. Наборы хранились в различных условиях во время

## DRG TM-CYFRA 21-1 ELISA (EIA-5070)

транспортировки, поэтому характеристики связывания планшет могут показать различный результаты.

- В соответствии с правилами национальной безопасности, с химическими продуктами и использованными для анализа реагентами необходимо обращаться как с опасными веществами.
- Паспорт безопасности данных для данного продукта имеется в наличии в DRG Instruments GmbH.
- Паспорт безопасности данных соответствует требованиям: EU-Guideline 91/155 EC.

### 4 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

#### 4.1 Содержимое набора

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 0,3% Проклин – консервант.
3. **Контроль**, 2 флаконы (в лиофилизированном виде), 1.0 мл  
см. «Подготовка реагентов»  
Контрольные значения и диапазоны указаны на этикетке флакона или в сертификате качества. Содержит 0,3% Проклин – консервант.
4. **Раствор для разведения образцов**, 1 флакон, 3 мл, готовый к использованию.  
Содержит 0,3% Проклин – консервант.
5. **Буфер для анализа**, 1 флакон, 7 мл, готовый к использованию. Содержит 0,3% Проклин – консервант.
6. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 1,2 мл, готовый к использованию,  
анти-CYFRA 21-1 антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена.  
Содержит 0,3% Проклин – консервант.
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию
8. **Стоп Раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый к использованию.  
Содержит 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
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.

#### 4.1.1 Необходимые материалы, не поставляемые с набором

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

#### 4.2 Хранение и стабильность набора

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

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

#### 4.3 Подготовка реагентов

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

## DRG TM-CYFRA 21-1 ELISA (EIA-5070)

### 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 0,5 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

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

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

### 4.4 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.

### 4.5 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 рекомендуется использовать в проведении анализа. Их необходимо хранить до принятия окончательного решения, после чего, ликвидировать в соответствии с официальными правилами.

## 5 ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

В этом анализе можно использовать сыворотку или плазму крови с гепарином.

Не подходят для тестирования гемолизированные, желтушные или липоидные образцы.

Не следует также использовать сыворотки, законсервированные азидом 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 °С to 8 °С. Для более длительного хранения (до 1 года) их необходимо заморозить до -20°С.

### 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:

## DRG TM-CYFRA 21-1 ELISA (EIA-5070)

- 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 ходдер 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. 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). Выстучать 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. Для подсчета концентраций необходимо принимать во внимание фактор разведения.

#### Пример типичной стандартной кривой

## DRG TM-CYFRA 21-1 ELISA (EIA-5070)

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 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 ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕДУРЫ

### 9.1 Динамический диапазон исследования

## DRG TM-CYFRA 21-1 ELISA (EIA-5070)

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: СА 15-3, СА 19-9, СА 125, СА 72-4.

### 9.3 Аналитическая 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.

% воспроизводимость 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

## DRG TM-CYFRA 21-1 ELISA (EIA-5070)

### 9.6 Линейность

Образец	Разведение	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

### 10.1 Интерферирующие вещества

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

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 400 нг/мл.

## 11 ЛИТЕРАТУРА

Литературу смотрите в оригинале инструкции