

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ОНКОМАРКЕР ЦИФРА 21-1 ІФА

TM-CYFRA 21-1 ELISA

Кат. № : EIA-5070

Дата випуску інструкції: 2018/08
Версія: 8.0



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ВСТУП

1.1 Призначення

Набір DRG TM-CYFRA 21-1 ІФА – це ферментний імуноаналіз для кількісного in vitro діагностичного вимірювання CYFRA 21-1 у сироватці або плазмі (гепарин- або цитратна плазма).

1.2 Короткий опис пояснення

Цитокератини - це епітеліальні маркери, експресія яких не втрачається під час злоякісної трансформації. CYFRA 21-1 - це фрагмент цитокератину-19, який розчиняється у сироватці і може використовуватися як циркулюючий пухлинний маркер. Хоча він виражається у всіх тканинах організму, основне його поширення спостерігається в легенях, особливо в тканинах раку легенів. CYFRA 21-1 - це чутливий і специфічний онкомаркер недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), особливо плоскоклітинного підтипу (1,2,3). Це також відображає ступінь захворювання та виконує незалежну прогностичну роль поряд із показником стану та стадією захворювання при NSCLC (4,5,6). Крім того, виявлення сироватки CYFRA 21-1 дозволяє ідентифікувати пацієнтів високого ризику, яким може бути корисною ад'ювантна хіміотерапія (7), і дозволяє раннє виявлення прогресуючого захворювання при рецидивуючих NSCLC (8). Крім того, CYFRA 21-1 був описаний як корисний маркер для плоскоклітинного раку стравоходу (9) та для моніторингу терапії раку сечового міхура (10).

ІФА TM-CYFRA 21-1 використовує два моноклональних антитіла миші KS19.1 та BM19.21 для визначення фрагментів цитокератину-19.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

ІФА DRG TM-CYFRA 21-1 - це твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА), заснований на **сендвіч-принципі**.

Мікротитрові лунки покриті моноклональним (мишачим) антитілом, спрямованим до унікального антигенного сайту молекули CYFRA 21-1.

Аліквота зразка пацієнта, що містить ендогенний CYFRA 21-1, інкубується у лунці, покритій ферментним кон'югатом, який є антитілом анти- CYFRA 21-1, кон'югованим з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат змивається.

Кількість зв'язаного кон'югату пероксидази пропорційна концентрації CYFRA 21-1 у зразку.

Після додавання розчину субстрату інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації CYFRA 21-1 у зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Набір призначений тільки для використання в in-Vitro діагностиці. Тільки для професійного використання.
- Усі реагенти даного набору, що містять сироватку або плазму людини, були протестовані затвердженнями FDA методами і дали негативні результати на ВІЛ 1/2, HBsAg і HCV. З усіма реагентами слід поводитися як з потенційно небезпечними під час використання та утилізації.
- Перед початком аналізу, уважно та повністю прочитайте інструкції з використання. Використовувати тільки діючу версію інструкції, які постачаються з набором. Переконайтеся, що все зрозуміло.
- Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористовувані лунки слід зберігати при температурі 2-8 °C в закритій упаковці, а також їх слід використовувати з рамкою, що постачається.
- Піпетування зразків та реагентів слід зробити якомога швидше та з однаковим інтервалом часу для кожного етапу.
- Використовуйте резервуари лише для окремих реагентів. Особливо це стосується резервуарів для субстрату. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакони, оскільки це може призвести до забруднення реагентами.

- Щоб отримати належні результати, слід ретельно перемішати вміст лунок. Не використовувати лунки повторно.
- Не допускати висихання лунок під час тестування; додавати реагенти одразу після етапу промивання.
- Довести реагенти до кімнатної температури (21-26°C) перед тестуванням. Температура може вплинути на аналіз зчитування абсорбції. Крім того, це не вплине на результати тестованих зразків.
- Не піпетувати ротом. Уникати контакту реагентів та зразків зі шкірою та слизовими.
- Не їсти, не пити і не користуватися косметикою у місцях обробки реагентів та зразків.
- Під час роботи зі зразками і реагентами використовувати одноразові рукавички. Мікробне забруднення реагентів та зразків може призвести до помилкових результатів.
- Поводитися з реагентами відповідно до процедур визначених відповідними національними настановами щодо безпеки біологічної небезпеки.
- Невикористовувати після закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці.
- Дотримуватися усіх вказаних об'ємів відповідно до протоколу. Оптиміальні результати можливі тільки при використанні каліброваних піпеток і зчитувача мікротитрових планшетів.
- Не змішувати компоненти із різних наборів і різних партій. Рекомендується не обмінювати лунки різних планшетів навіть однієї партії. Можливо, набори були відвантажені або зберігалися в різних умовах, а характеристики зв'язування планшетів можуть дещо відрізнятись.
- Уникати контакту зі Стоп-розчином, що містить 0.5 M H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
- Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і/або MIT в якості консервантів. У випадку попадання в очі або на шкіру, негайно промити водою.
- ТМБ субстрат має подразнюючий вплив на шкіру або слизову. У випадку можливого контакту промити очі достатньою кількістю води і вмити руки з милом і водою. Помити забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні вивести людину на свіже повітря.
- Хімікати та приготовлені або використовувані реагенти слід вважати небезпечними відходами відповідно до встановлених правил.
- За додатковою інформацією звертатися до Паспорту безпеки. Паспорт безпеки для цього продукту доступний за запитом або безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

- Мікротитровий планшет** 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок. Лунки покриті анти-CYFRA 21-1 антитілом (моноклональним).
- Стандарт (Стандарт 0 - 4)**, 5 флаконів, 1 мл кожен, ліофілізовані; Концентрації: 0-3-10-25-50 нг/мл Див. «Підготовка реагентів». Містить консервант без ртуті.
- Контролі Низький і Високий**, 2 флакони, 1.0 мл кожен, ліофілізовані; див. «Підготовка реагентів». Контрольні значення і діапазони вказані на етикетці флакону або сертифікаті якості. Див. «Підготовка реагентів». Містить консервант без ртуті.
- Розчинник для зразків**, 1 флакон, 3 мл, готовий для використання; Містить консервант без ртуті.
- Буфер для аналізу**, 1 флакон, 7 мл, готовий для використання; Містить консервант без ртуті.
- Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 1,2 мл, готовий для використання, анти-CYFRA 21-1 антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому. Містить консервант без ртуті.
- Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий для використання; Тетраметилбензидин (ТМБ).
- Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання; Містить 0.5 M H₂SO₄. Уникати контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення та опіки.
- Промивний розчин**, 1 флакон, 30 мл (40X концентрований) Див. „Підготовка реагентів“.

Примітка: Додатковий Розчинник для зразків доступний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, що не постачаються з набором

- Мікротитровий відкалібрований зчитувач планшетів (450 ± 10 нм) (напр. Мікропланшетний зчитувач виробництва DRG Instruments).
- Калібрувальні змінні прецизійні мікропіпетки.
- Абсорбуючий папір
- Дистильована або деіонізована вода
- Таймер.

– Графічний папір або програмне забезпечення для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

За умови зберігання при температурі від 2 °С до 8 °С нерозкриті реагенти зберігатимуть реакційну здатність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після зазначеної дати.

Відкриті реагенти слід зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С. Мікротитрові лунки слід зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С. Після відкриття мішечка з фольги слід подбати про те, щоб знову щільно закрити його.

Відкриті набори зберігають активність протягом 8 тижнів, якщо зберігати їх, як описано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням слід привести всі реагенти і необхідну кількість реагентів до кімнатної температури.

Стандарти

Відновити ліофілізований вміст кожного флакону з 1 мл деіонізованої води і залишити постояти принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі. Перемішати кілька разів перед використанням.

Примітка: *ВВідновлені стандарти стабільні протягом 8 тижнів при температурі 2 – 8 °С. Для більш тривалого зберігання слід заморозити при – 20 °С.*

Контролі

Відновити ліофілізований вміст кожного флакону з 1.0 мл деіонізованої води та залишити на 10 хвилин. Перед використанням перемішати контроль декілька разів.

Примітка: *Відновлені контролі стабільні протягом 8 тижнів при температурі 2 – 8 °С. Для тривалого зберігання слід заморозити при – 20 °С.*

Промивний розчин

Додати деіонізовану воду до 40X концентрованого Промивного розчину. Розвести 30 мл концентрованого Промивного розчину зі 1170 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл.

Розведений Промивний розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору слід проводити відповідно до національних вимог. Спеціальна інформація для цього продукту знаходиться у Паспорті Безпеки Даних, розділ 13.

4.6 Пошкоджені набори

У разі серйозних пошкоджень тестового набору або компонентів, DRG слід повідомити про це письмово, не пізніше, ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені одиничні компоненти не слід використовувати для пробного запуску. Їх потрібно зберігати, поки не буде знайдено остаточне рішення. Після цього їх слід утилізувати відповідно до офіційних правил.

5. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У цьому аналізі можна використовувати сироватку або плазму (гепарин- або цитратна плазма). Використання плазми ЕДТА призводить до збільшення значень.

Не використовуйте гемолітичні, жовтяничні або ліпемічні зразки.

Зверніть увагу: Зразки, що містять азид натрію, не слід використовувати для аналізу.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Зібрати кров шляхом пункції вени (наприклад, Сарстедт Моновет для сироватки), дати згорнутися і відокремити сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугувати до повного згортання. Для зразків пацієнтів, які отримують антикоагулянтну терапію, може знадобитися більше часу для згортання.

Плазма:

Зразки цільної крові слід помістити у центрифужні пробірки з антикоагулянтами і центрифугувати одразу після забору. (напр. Sarstedt Monovette – з відповідно приготовленою плазмою)

5.2 Підготовка і зберігання зразків

Зразки слід закрити та зберігати протягом 5 днів при температурі від 2 °С до 8 °С перед аналізом.

Зразки, що зберігаються протягом тривалого часу (до 18 місяців), слід заморожувати лише один раз при –20 °С перед аналізом. Розморожені зразки слід перевернути кілька разів перед тестуванням.

Перекладач Романюк Н. П.

5.3 Розведення зразків

Якщо в початковому аналізі виявлено, що зразок містить більше, ніж найвищий стандарт, зразки можна розвести *Розчинником для зразків* і повторно проаналізувати, як описано в Процедурі аналізу.

Для розрахунку концентрацій слід враховувати цей коефіцієнт розведення.

Наприклад:

- а) розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл *Розчинника для зразків* (ретельно перемішати)
- б) розведення 1:100: 10 мкл розведення, а) 1:10 + 90 мкл *Розчинника для зразків* (ретельно перемішати)

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Основні зауваження

- Перед використанням всі реагенти і зразки повинні досягнути кімнатної температури. Всі реагенти слід змішувати без піноутворення.
- Після початку тесту всі кроки слід виконувати без перерви.
- Використовуйте нові одноразові наконечники для піпеток для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція - це функція часу інкубації та температури. Перед початком аналізу рекомендується підготувати всі реагенти, зняти ковпачки, закріпити всі необхідні лунки в тримачі і т. д. Це забезпечить рівномірний час, що минув для кожного кроку піпетування без перерви.
- Як правило, ферментативна реакція лінійно пропорційна часу та температурі.

6.2 Процедура тесту

Кожен аналіз повинен включати стандарту криву.

1. Закріпити потрібну кількість лунок мікротитрових лунок у тримачі рамки.
2. Внести у кожен лунку по **50 мкл Буферу для аналізу**.
3. Додати по **10 мкл Ферментного кон'югату** у кожен лунку.
4. Внести по **50 мкл кожного Стандарту, Контролю і зразків новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки. Ретельно перемішати протягом 10 секунд. Ретельне перемішування дуже важливе на даному етапі.
5. Інкубувати протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
6. Різкі витрусити вміст з лунок. Промити лунки **3 рази** розведеним Розчином для промивання по **350 мкл** на лунку. Постукати лунками по абсорбуючому папері, щоб видалити залишки води.
Важливо: Чутливість і точність даного аналізу значно залежить від правильності проведення процедури промивання!
7. Додати по **100 мкл Розчину Субстрату** у кожен лунку.
8. Інкубувати протягом **15 хвилин** при кімнатній температурі.
9. Зупинити ферментативну реакцію можна додавши по **100 мкл Стоп-Розчину** у кожен лунку.
10. Визначити абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450 ± 10 нм** за допомогою мікротитрового планшетного зчитувача. Рекомендується зчитувати лунки **протягом 10 хвилин** після додавання *Стоп-Розчину*.

6.3 Підрахунок результатів

1. Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнтів.
2. Використовуючи лінійний міліметровий папір, побудуйте стандартну криву, позначивши середнє значення поглинання, отримане від кожного стандарту, щодо його концентрації зі значенням поглинання по вертикальній осі (Y) та концентрації по горизонтальній осі (X).
3. Використовуючи середнє значення поглинання для кожного зразка, визначити відповідну концентрацію за стандартом.
4. Автоматичний метод: Результати в Інструкції з використання були розраховані автоматично з використанням 4-параметрової кривої. (4 параметри Rodbard або 4 параметра Marquardt є найкращими методами.) Інші функції зменшення даних можуть дати дещо інші результати.
5. Концентрацію зразків можна зчитати безпосередньо з цієї стандартної кривої. Зразки з концентрацією, що перевищує концентрацію найвищого стандарту, слід додатково розводити або повідомляти як > 50 нг / мл. Для розрахунку концентрацій слід враховувати цей коефіцієнт розведення.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані призначені лише для демонстрації і не можуть використовуватися замість генерації даних на момент аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (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. ОЧІКУВАНЕ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується кожній лабораторії визначати свої власні нормальні та патологічні показники. У дослідженні, яке проводили на перший погляд із здоровими дорослими, з використанням ІФА DRG TM-CYFRA 21-1, спостерігали такі дані:

Населення	К-сть	Середнє (нг/мл)	Медіана (нг/мл)	5 ^а - 95 ^а процентиль (нг/мл)	Діапазон (мін. – макс.) (нг/мл)
Чоловіки	121	0.61	0.60	0.10 – 1.33	0.00 – 2.53
Жінки	119	0.58	0.46	0.00 – 1.38	0.00 – 1.98

Згідно декількох досліджень рекомендована cut-off концентрація 3,3 нг/мл для CYFRA 21-1, оскільки всі пацієнти без захворювань та 95% пацієнтів з доброякісними захворюваннями легенів виявляються нижче цього значення (1,2,3).

Одні результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати слід порівняти з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Хороша лабораторна практика вимагає, щоб контролі запускалися з кожною калібрувальною кривою. Статистично значна кількість контролів повинна бути проаналізована для встановлення середніх значень та допустимих діапазонів для забезпечення належних показників. Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних та федеральних правил. Рекомендується використовувати контрольні зразки для забезпечення щоденної достовірності результатів. Використовуйте контролі як на нормальному, так і на патологічному рівнях. Контроль та відповідні результати лабораторії контролю якості вказані в сертифікаті контролю якості, який надається з набором. Значення та діапазони, зазначені на Сертифікаті контролю якості, завжди стосуються поточної партії набору і повинні використовуватися для безпосереднього порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості, щоб забезпечити точність результатів. Використовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень та тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим допустимим діапазонам контролів, результати пацієнта слід вважати недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні зони: Пристрої для виведення піпеток та синхронізації; фотометр, терміни придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, методи аспірації та промивання. Якщо ви перевірили вищезазначені пункти і не знайшли жодної помилки, зв'яжіться безпосередньо зі своїм дистриб'ютором або DRG.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон дослідження

Діапазон дослідження становить 0.079 нг/мл – 50 нг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Антитіла використані для DRG TM-CYFRA 21-1 ІФА є специфічними для Кератину 19.

9.3 Чутливість

Межа бланку (LoB) становить 0.079 нг/мл.

Межа виявлення (LoD) становить 0.185 нг/мл.

Межа кількості (LoQ) становить 0.343 нг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 В аналізі

Варіабельність в аналізі показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	80	1.90	6.4
2	80	4.31	3.5
3	80	12.68	2.7
4	80	33.89	3.4

9.4.2 Між аналізами

Варіабельність між аналізами показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	80	1.90	11.7
2	80	4.31	7.1
3	80	12.68	5.5
4	80	33.89	5.7

9.4.3 Між лотами

Зміни між аналізами (між лотами) визначали шляхом повторних вимірювань зразків з 3 різними лотами наборів.

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	18	2.62	2.5
2	18	8.68	5.1
3	18	11.07	2.5
4	18	32.75	5.2

9.5 Відновлення

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4	Зразок 5	Зразок 6	
Концентрація (нг/мл)	2.24	5.90	10.06	15.98	23.14	38.67	
Середнє відновлення (%)	91.7	94.5	95.4	94.1	94.9	94.8	
Діапазон відновлення (%)	Від	87.7	89.1	89.3	91.4	91.3	90.9
	до	101.8	105.5	104.1	98.6	100.1	98.1

9.6 Лінійність

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4	Зразок 5	Зразок 6	
Концентрація (нг/мл)	11.60	26.95	45.05	15.55	22.52	37.62	
Середнє відновлення (%)	99.8	103.8	101.8	103.8	104.3	100.1	
Діапазон відновлення (%)	Від	95.5	100.8	95.9	101.8	99.8	95.8
	до	104.0	108.3	109.1	108.7	107.2	104.6

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу буде виконана з повним розумінням інструкції, що міститься в упаковці, та з дотриманням належної лабораторної практики. Будь-яка неправильна обробка зразків або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг / мл), білірубін (до 0,5 мг / мл) та тригліцериди (до 7,5 мг / мл) не впливають на результати аналізу.

Аналіз містить реагенти для мінімізації інтерференції НАМА та гетерофільних антитіл.

10.2 Інтерференції лікарських засобів

До сьогодні ще не відомі жодні речовини (ліки), які впливають на вимірювання CYFRA 21-1 у зразку.

10.3 Хук-ефект високої дози

Хук-ефект в цьому тесті не спостерігався до концентрації 1000 нг/мл CYFRA 21-1

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Тестування повинно проводитися точно відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (належної лабораторної практики) або інших встановлених національних стандартів та/або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в процедуру тестування достатню кількість контролів для перевірки достовірності та точності тесту.

Результати тестувань є дійсними лише у тому випадку, якщо всі контролі знаходяться в межах зазначених діапазонів і якщо всі інші параметри тестувань також знаходяться в межах заданих специфікацій аналізу. У разі будь-яких сумнівів або занепокоєння, будь ласка, зв'яжіться з DRG.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки ніколи не повинні базуватися лише на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тестів узгоджуються з предметами, як зазначено в пункті 11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки в тих випадках, коли лабораторні результати є прийнятними для загальної клінічної картини пацієнта, слід робити терапевтичні висновки.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним фактором, для визначення будь-яких терапевтичних висновків.

11.3 Відповідальність

Будь-яка модифікація тестового набору та/або обмін або змішування будь-яких компонентів різних партій від одного тестового набору до іншого може негативно вплинути на заплановані результати та валідність загального тесту. Така модифікація та/або обмін втрачають силу будь-якої вимоги щодо заміни.

Претензії, подані через неправильне тлумачення замовником лабораторних результатів відповідно до пункту 11.2, також є недійсними. Незважаючи на це, у випадку будь-якої претензії відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Виробник не несе відповідальності за пошкодження тестового набору під час транспортування.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

