

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	6
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11. ЛІТЕРАТУРА	8

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНУ CYFRA 21-1 В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «CYFRA 21-1-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «CYFRA 21-1-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації антигену CYFRA 21-1 в сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Антиген CYFRA 21-1 - це фрагмент цитокератину 19, що утворюється в результаті протеолізу і, на відміну від основної цитокератинової структури, здатний переходити в розчинну форму і виходити в системний кровотік. Молекула-попередник антигену CYFRA 21-1 - цитокератин 19 - експресується у всіх нормальних тканинах, але особливо високий ступінь експресії спостерігається в клітинах пухлин легенів або стінки сечового міхура.

1.3. Підвищений вміст CYFRA 21-1 спостерігається в крові хворих пухлинами легень (переважно плоскоклітинним раком, рідше аденокарциномою і іншими гістологічними формами) і пухлинами сечового міхура. Визначення антигену CYFRA 21-1 є корисним для контролю ефективності лікування та спостереження за перебігом цих пухлин; разом з тим, результати вимірювання антигену CYFRA 21-1 завжди слід інтерпретувати в комплексі з результатами інших методів дослідження та клінічними даними.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення антигену CYFRA 21-1 ґрунтується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла проти розчинного цитокератину 8/19 (CYFRA 21-1). У лунках планшета, при додаванні досліджуваного зразка, відбувається зв'язування CYFRA 21-1, що міститься в досліджуваному зразку, з антитілами на твердій фазі.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югату моноклональних антитіл проти антигену CYFRA 21-1 з пероксидазою хрину. В результаті утворюється зв'язаний з твердою фазою «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації антигену CYFRA 21-1 в досліджуваному зразку. Концентрацію антигену CYFRA 21-1 в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту антигену CYFRA 21-1 в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція мишачих моноклональних антитіл проти розчинного антигену цитокератину 8/19 (CYFRA 21-1) з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
CA125	<0.1
CA19-9	<0.1
CA15-3	<0.1
Альфа-фетопротеїн	<0.1
ПСА	<0.1

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення змісту CYFRA 21-1 у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «CYFRA 21-1-ІФА» не перевищує 8.0%.

Коефіцієнт варіації (CV) для зразків, виміряних на двох партіях Набору реагентів «CYFRA 21-1-ІФА» (Intra-assay).

Зразок, №	К-ть повторів	значення, нг/мл	CV1, %
1	5	4.1	4.2
2	5	15.4	3.3
3	5	7.2	3
4	5	26.9	3.2
5	5	16.4	4.1

Коефіцієнт варіації (CV) для зразків, виміряних на одній партії Набору реагентів «CYFRA 21-1-ІФА» протягом трьох днів (Inter-assay)

Зразок, №	К-ть повторів	значення, нг/мл	CV1, %
1	5	4.2	5.5
2	5	15.4	4.3
3	5	7	6
4	5	24.8	3.4
5	5	15.9	4.7

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації CYFRA 21-1 в зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить CYFRA 21-1, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 3-50 нг/мл і становить $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» - відповідність вимірної концентрації CYFRA 21-1 підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки і калібрувальної проби 10 нг/мл. Відсоток «відкриття» становить 90-110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «CYFRA 21-1-ІФА» концентрація CYFRA 21-1 в сироватці (плазмі) крові не перевищує 0.5 нг/мл.

3.6. Хук-ефект (hook-effect) високих концентрацій.

При використанні Набору «CYFRA 21-1-ІФА» хук-ефект не виявлений до концентрації CYFRA 21-1 1000 нг/мл.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Н	К-.....	Д.	Опис
1 P236Z	SORB MTP	Планшет 96-лун з стрип	1	шт.	-
2 C236Z	CAL 1-5	Калібрувальні проби на основі фосфатного буфера (рН 7.2-7.4), антиген СУFRA 21-1 – 0; 3; 10; 25; 50 нг/мл, готові (кал проба % – 2 мл, – по 0.8 мл к)	5	шт.	прозорі рідини червоного кольору (калібрувальна проба С1 - прозора безбарвна рідина)
3 Q236Z	CONTROL	Контроль с и на основ антиген СУFRA 21-1, готова (0.8 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
4 T236Z	CONJ HRP	Конвогат, готов	1	шт.	прозора рідина яскраво-червоного кольору
5 R055Z	SUBS TMB	субстрат тетраметилбензидину, готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
6 S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання, 26х-кратний (22 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
7 R050Z	STOP	Стоп-реагент, готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
8 N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт.	
9 K236I	-	Інструкція з використання Набору реагентів «СУFRA 21-1-ІФА»	1	шт.	-
10 K236Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «СУFRA 21-1-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має дратівну дію. Уникати розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потрапленні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись «Правил устрою, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР» (Москва, 1981 р.).

5.3. При роботі з Набором слід надягати одноразові гумові або пластикові рукавички, оскільки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 10–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. У разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «CYFRA 21-1-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25°C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 42 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних проб та 1 проби контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;

- кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;

- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;

- концентрат розчину для відмивання, який залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності;

- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб;

Важливе зауваження. Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) крові необхідно зберігати при -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищенні) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторях та 12 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Якщо очікувана концентрація CYFRA 21-1 у досліджуваному зразку перевищує 50 нг/мл, зразок слід додатково розвести, використовуючи калібрувальну пробу С1. Використання інших буферів чи реагентів для розведення зразків може призвести до помилкових результатів. Примітка: в такому випадку для отримання надійних результатів рекомендуємо використовувати декілька послідовних розведень досліджуваного зразка сироватки (плазми) крові.
3	Внесіть у відповідні лунки в двох повторях по 50 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки . В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторях по 50 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
4	Внесіть у всі лунки по 50 мкл кон'югату.
5	Обережно перемішайте вміст планшета на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для закляювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 60 хвилин при температурі +37 °С.
6	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмійте лунки 5 разів . При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див.п.7.3), струшуйте планшет круговими рухами на горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
7	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину . Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно здійснити протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10-20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
8	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
9	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно здійснити протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробєю С1 або за повітрям.
10	Побудуйте в лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація CYFRA 21-1 в калібрувальних пробах (нг/мл), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод.
11	Визначте за калібрувальним графіком вміст CYFRA 21-1 в досліджуваних зразках. У разі попереднього розведення досліджуваного зразка (див. п.2), необхідно домножити отриманий результат на фактор розведення.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка: значення концентрацій CYFRA 21-1 в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.5 нг/мл), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (50 нг/мл) належить наводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація CYFRA 21-1 нижча за 0.5 нг/мл» або «вища за 50 нг/мл».

Досліджувана група	Одиниці, нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа
Здорові донори	-	3.0

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Petra Stieber CYFRA 21-1 (Cytokeratin-19-Fragment), in: Lothar Thomas, Labor und Diagnose, TH Brooks, Frankfurt, Germany
2. J-L Pujol, O Molinier, W Ebert et al. (2004) British Journal of Cancer 90 (11):2097-2105

З питань якості Набору «**CYFRA 21-1-ІФА**»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: +38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»

Коваленко Еліна Володимирівна