

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2010 г.

№ _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

11 января 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения

антигена CYFRA 21-1 в сыворотке (плазме) крови

«CYFRA 21-1-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «CYFRA 21-1-ИФА» предназначен количественного определения концентрации антигена CYFRA 21-1 в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Антиген CYFRA 21-1 представляет собой фрагмент цитокератина 19, образующийся в результате протеолиза и, в отличие от основной цитокератиновой структуры, способный переходить в растворимую форму и выходить в системный кровоток. Молекула-предшественник антигена CYFRA 21-1 - цитокератин 19 - экспрессируется во всех нормальных тканях, но особенно высокая степень экспрессии наблюдается в клетках опухолей легких или стенки мочевого пузыря.

Повышенное содержание CYFRA 21-1 наблюдается в крови больных опухолями легких (преимущественно плоскоклеточным раком, реже аденокарциномой и другими гистологическими формами) и опухолями мочевого пузыря. Определение уровня антигена CYFRA 21-1 полезно для контроля эффективности лечения и слежения за течением этих опухолей; вместе с тем, результаты измерения антигена CYFRA 21-1 всегда следует интерпретировать в комплексе с результатами других методов исследования и клиническими данными.

1.3. Диагностическая значимость определения. Определение CYFRA 21-1 в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики опухолей легких и опухолей мочевого пузыря различной этиологии.

1.4. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение антигена CYFRA 21-1 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к растворимому цитокератину 8/19 (CYFRA 21-1). В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание CYFRA 21-1, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата моноклональных антител к антигену CYFRA 21-1 с пероксидазой. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу.

Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит

окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации CYFRA 21-1 в исследуемом образце. Концентрацию антигена CYFRA 21-1 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания антигена CYFRA 21-1 в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными антителами к CYFRA 21-1; готов к использованию - **1 шт.**;
- **калибровочные пробы** на основе фосфатного буфера, содержащие известные количества антигена CYFRA 21-1 - **0; 3; 10; 25 и 50 нг/мл**; концентрации антигена CYFRA 21-1 в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - **5 пробирок или флаконов** (по 0,8 мл каждая; калибровочная проба 0 нг/мл – 6,0 мл);
- **конъюгат**; готов к использованию - **1 флакон (6,0 мл)**;
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**; готов к использованию - **1 флакон (11 мл)**;
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием антигена CYFRA 21-1; готова к использованию - **1 пробирка или флакон (0,8 мл)**;
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - **1 флакон (22 мл)**;
- **стоп-реагент**; готов к использованию - **1 флакон (11 мл)**;
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - **2 шт.**;
- **аналитический паспорт**;
- **Инструкция по применению Набора.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к растворимому антигену цитокератина 8-19 (CYFRA 21-1) с другими анализатами приведена в Таблице.

Аналит	Перекрестная реакция %
Антиген СА 125	<0,1
Антиген СА 19-9	<0,1
Антиген СА 15-3	<0,1
α-фетопроtein (АФП)	<0,1
Простатаспецифический антиген (ПСА)	<0,1

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «CYFRA 21-1-ИФА» концентрация CYFRA 21-1 в сыворотке (плазме) крови не превышает 1,0 нг/мл.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания CYFRA 21-1 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «CYFRA 21-1-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации CYFRA 21-1 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 10,0 нг/мл

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации CYFRA 21-1 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей CYFRA 21-1, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 3,0-50 нг/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.6. Хук-эффект (*hook-effect*) высоких концентраций. При использовании Набора «CYFRA 21-1-ИФА» хук-эффект не обнаружен до концентрации CYFRA 21-1 1000 нг/мл.

3.7. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы	
	нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	0,3	3,0

В соответствии с требованиями **GLP** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «CYFRA 21-1-ИФА» уточнить значения концентрации CYFRA 21-1, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 25-250 мкл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре минус 20°C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «CYFRA 21-1-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации CYFRA 21-1 в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация CYFRA 21-1 в исследуемом образце превышает 50 нг/мл, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0 нг/мл.

Использование других буферов и реагентов для разбавления может исказить результаты определения.

7.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.2. Внести во все лунки планшета по 50 мкл конъюгата.

Внесение конъюгата в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.3. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при температуре $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

7.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.5. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 15-25 мин. в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.6. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре, планшет допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 4 ч.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация антигена CYFRA 21-1 в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП_{450}). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание CYFRA 21-1 в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п. 7.1.), следует умножить полученный результат на фактор разведения

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «CYFRA 21-1-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;
- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20°C в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 5 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «CYFRA 21-1-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского

отдела ООО «ХЕМА»

к. б. н. Д. С. Кострикин

11 январа 2010 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО РМАПО Росздрава

д.м.н., профессор В. В. Долгов

