

НАБОР CYFRA 21.1 [¹²⁵I] IRMA (Номер по каталогу: RK-211CT и RK-211CT50)

Набор CYFRA 21.1 предназначен для прямого количественного определения фрагментов Цитокератина 19 в сыворотке человека *in vitro* в диапазоне 0-60 нг/мл. Каждый набор содержит материал, достаточный для 100 или 50 аналитических пробирок, позволяющих построить одну калибровочную кривую и провести количественное определение 42 (RK-211CT) или 17 (RK-211CT50) неизвестных образцов в двух экземплярах.

Введение

Цитокератин 19 является одним из более чем 20 полипептидных цитокератинов, которые образуют промежуточных филамент эпителиальных клеток. Он представляет собой кислый цитоплазматический белок с молекулярной массой 40000 Да. Цитокератиновые филаменты слабо растворимы, но после протеолиза образуются растворимые фрагменты, которые попадают в биологические жидкости.

Набор CYFRA 21.1 IRMA позволяет с помощью иммуноанализа определить концентрацию Цитокератина 19 в сыворотке. Определение основано на использовании двух моноклональных антител: VM 19.21* и KS 19.1*, которые связываются с различными эпитопами, расположенными на С-терминальном отделе молекулы.

Повышенная концентрация фрагментов Цитокератина 19 в сыворотке наблюдается у пациентов с немелкоклеточным раком легких. Набор CYFRA 21.1 IRMA не предназначен для проведения скрининга. Между тем, он является эффективным средством для мониторинга прогрессирования заболевания, контроля лечения, раннего выявления рецидивов и наблюдения за пациентами.

Принцип метода

Технология предусматривает использование двух высокоаффинных моноклональных антител в системе иммунорадиометрического анализа (IRMA). Сигнальное антитело, меченное ¹²⁵I (VM19.21*) связывается с эпитопом молекулы, который пространственно отличается от распознанного биотин-связанного антитела (KS19.1*). Эти два антитела реагируют одновременно с презентированным антигеном в стандартах или образцах, что приводит к формированию комплекса **связанное антитело - антиген - сигнальное**

антитело, также именуемого как «сэндвич». Во время инкубационного периода в течение суток при температуре 2-8 °С иммунокомплекс иммобилизуется на реактивную поверхность пробирок, покрытых стрептавидином

Реакционная смесь после этого удаляется, пробирки тщательно промываются, радиоактивность измеряется с помощью гамма-счётчика.

Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Неизвестная концентрация в образцах пациентов может быть определена по калибровочной кривой, построенной на основании значений радиоактивности ряда калибраторов, содержащих известное количество CYFRA 21.1.

*Антитела Fujirebio Diagnostics Inc



Содержание набора

1. Один флакон МЕТКИ (11 мл), готовый к использованию, содержащий <980 кБк ¹²⁵I-анти- CYFRA 21.1 антитело и биотин-связанное антитело в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.
2. Один флакон (10 мл) готового к использованию РАСТВОРИТЕЛЯ на основе лошадиной сыворотки с 0.1% NaN₃.
3. Шесть флаконов лиофилизированных СТАНДАРТОВ S0-S5 (6 x 1 мл) в лошадиной сыворотке с 0.1% NaN₃. Концентрации стандартов указаны в прилагаемых сертификатах качества. *Калибровка количественного определения проводится с помощью набора CYFRA 21.1IRMA компании Fujirebio Diagnostics Inc.*
4. Два флакона лиофилизированной КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 1 мл) в человеческой сыворотке с 0.1% NaN₃. Концентрации контрольных сывороток указаны в прилагаемых сертификатах качества.
5. ПРОБИРКИ С ПОКРЫТИЕМ, готовые к использованию. Пробирки 12x75 мм, упакованные в пластмассовые коробки (**RK-211CT**: 2 коробки, 2x50 пробирок, **RK-211CT50**: 1 коробка, 1x50 пробирок).
6. Один флакон КОНЦЕНТРАТ ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащий 0.2% NaN₃. См. раздел «Подготовка реактивов».

Сертификат качества.

Листок-вкладыш.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

- общее лабораторное оборудование
- высокоточные микропипетки 100 мкл
- автоматические пипетки 100 мкл
- автоматические пипетки 2000 мкл или диспенсер
- полимерная плёнка, покрывающая пробирки
- абсорбирующая ткань
- гамма-счётчик с программным обеспечением

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общими процедурами, используемыми в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликваты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (- 20 °С). Замороженные образцы должны быть полностью разморожены и аккуратно перемешаны перед оценкой.

Следует избегать использования гемолизированных и липемических образцов сыворотки.

Образцы с концентрацией CYFRA 21.1 свыше 60 нг/мл должны быть разведены с Растворителем (P) и повторно оценены. Рекомендуемое разведение: 10-кратное (450 мкл P + 50 мкл образца).

Подготовка реактивов, хранение

После вскрытия реактивы следует хранить при температуре 2-8°С. При этой температуре каждый реактив устойчив до окончания срока годности набора.

Флакон с меткой должен храниться при температуре 2-8°С непосредственно до использования!

Восстановите стандарты и контрольные образцы с помощью 1 мл дистиллированной воды перед использованием. Спустя 20 минут легко перемешайте.

Для дальнейшего использования приготовьте аликваты и храните в условиях заморозки!

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды, чтобы получить 720 мл промывочного раствора. Приготовленный раствор хранить при температуре 2-8°С до окончания срока годности набора.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1).

1. Промаркируйте по два экземпляра пробирок с покрытием для каждого стандарта (S0-S5), контрольной сыворотки и исследуемого образца. Для определения общей радиоактивности

- (Т) необходимо промаркировать дополнительно 2 обычные пробирки.
- Переместите с помощью пипеток по 100 мкл стандартов, исследуемых образцов и контролей в соответствующие промаркированные пробирки. Закрепите пробирки в штативе. Не касайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
 - Поместите по 100 мкл метки в каждую пробирку. Слегка перемешайте содержимое пробирок.
 - Запечатайте все пробирки полимерной пленкой. Инкубируйте при температуре 2-8 °С в течение 20 ± 2 часов.
 - В каждую пробирку добавьте по 2.0 мл разведённого промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок, перевернув штатив. Расположите штатив в перевернутом состоянии на фильтровальную бумагу в течение 2 минут.
 - Верните штатив с пробирками в исходное положение и повторите шаг 5 еще два раза.
 - Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик не менее чем на 60 секунд
 - Вычислите концентрации CYFRA 21.1 образцов как описано в разделе «Расчёт результатов» или используйте специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения. Методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Общее количество	Стандарт	Контроль	Образец
Стандарт		100		
Контроль			100	
Образец				100
Метка	100	100	100	100
Инкубируйте при температуре 2-8 °С в течение 20 ± 2 часов				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слейте жидкость и поставьте перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Определите уровень радиоактивности (60 секунд/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

Расчёт результатов

Расчёт результатов представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные количественного

определения должны быть сходными с данными, указанными в таблице 2. Вычислите среднее значение радиоактивности в минуту (CPM) для каждой пары образцов. Вычислите нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$V/T (\%) = \frac{S_{1-5} / C_{1-1} / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

На полулогарифмической бумаге для каждой концентрации CYFRA 21.1 отложите напротив соответствующие значения V/T (%) для каждого стандарта. При помощи полученных точек постройте калибровочную кривую.

Определите концентрацию CYFRA 21.1 неизвестных образцов с использованием калибровочной кривой. Значениями, очевидно лежащими за пределами кривой, можно пренебречь.

Рекомендуется для обработки данных использовать программное обеспечение.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки и	Среднее (CPM)	% V/T	CYFRA 21.1 нг/мл
T	304068		
S0	812	0.3	0
S1	4026	1.3	1.1
S2	10446	3.4	4.7
S3	25735	8.5	13
S4	52315	17.2	27
S5	99240	32.6	54
CI	11438	3.8	5.3
СП	31914	10.5	16.3

Рабочие характеристики

Специфичность

Использование антител в этом количественном определении гарантирует измерения, полностью специфичные для CYFRA 21.1.

Чувствительность

На основании результатов 120 исследований с 60 холостыми растворами и 60 образцами с низкой концентрацией с 95% вероятностью были определены следующие пределы обнаружения:

Предел холостого раствора (ПХ): 0,035 нг/мл

Предел обнаружения (ПО): 0,24 нг/мл

Для значений ниже ПХ необходимо указать - «анализируемый образец не обнаружен». Для значений между ПХ и ПО необходимо указать - «анализируемый образец обнаружен», концентрация менее 0,24 нг/мл.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариальности были проанализированы 3 образца сыворотки по 20 повторных исследований. Для определения межсубъектной вариальности они были измерены дважды в ходе 12 независимых анализов. Полученные результаты показаны ниже.

Внутрисубъектная вариальность		Межсубъектная вариальность	
Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)	Среднее значение (ЕД/мл)	Коэффициент вариации (%)
1.11	4.16	1.31	9.25
4.37	7.48	5.52	8.77
21.27	7.05	26.3	6.98

Эффект высокой дозы

Для концентраций ниже 400 нг/мл эффект высокой дозы не наблюдается.

Ожидаемые значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные интервалы эталонных значений для популяции пациентов.

Были оценены образцы сыворотки донорской крови 200 практически здоровых лиц. Во всех образцах концентрация составила менее 2 нг/мл.

Сравнение методов

CYFRA 21.1 IRMA (Y) сравнивался с Fujirebio Fujirebio Diagnostics Inc. CYFRA 21.1 IRMA (X) на 98 образцах в пределах диапазона 0-60 нг/мл. С помощью линейного регрессионного анализа были получены следующие результаты:

$$Y = 1,0314X + 0.0762 \quad R^2 = 0.9814$$

Примечания к методике

- Невыполнение условий инструкции достоверно влияет на результаты.
- Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей
- Источник ошибки!** Пробирки для проведения реакции, упакованные в пластмассовых коробках, индивидуально не маркированы. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перепутать их с обычными пробирками. Для минимизации риска никогда не берите из пластмассовой коробки больше пробирок, чем это необходимо, после работы помещайте оставшиеся пробирки назад в коробку. Рекомендуется маркировать пробирки для количественного определения с помощью маркера.

Ограничения метода

- Количественное определение CYFRA 21.1 не должно использоваться в качестве скрининга для выявления злокачественного новообразования.
- Значения CYFRA 21.1 ≥ 2 нг/мл могут быть выявлены у некоторых здоровых людей и у пациентов с доброкачественными состояниями.
- Значения CYFRA 21.1 менее 2 нг/мл не свидетельствуют об отсутствии резидуальных опухолей.
- Результаты должны интерпретироваться с учётом всех клинических данных пациента, включая историю болезни, данные дополнительных исследований и других диагностических процедур.
- Образцы плазмы, забранные от пациентов, ранее получавших с диагностической или терапевтической целью препараты, содержащие мышиные моно-клональные антитела, могут содержать человеческие анти-мышиные антитела (НАМА). Поэтому исследование образцов, полученных от таких пациентов, может сопровождаться появлением ошибочных результатов.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуноферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (анти-НСV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Продукты животного происхождения, использованные в наборе, были получены у

здоровых животных. Тем не менее с продуктами животного происхождения следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.


















Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 69 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Срок годности		Контроль
	Код партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	См. руководство по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики in vitro		Раствор для разведения сыворотки
	Производитель		Хранить при температуре 2-8°C
	Номер по каталогу		Радиоактивный материал
			

Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

ООО «Институт изотопов»

1535 Будапешт. P.F.: 851.

Тел.: (36-1) 392-2577,

Факс: (36-1) 395-9247

Замечание об авторских правах

CYFRA 21.1™ является торговой маркой Fujirebio Diagnostics Inc (FDI). Набор

CYFRA 21.1 IRMA основан на использовании антител KS 19.1 и BM 19.21, которые получены только у FDI и её официальных дистрибьюторов.



обновлено: март 2021