

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОКАЛЬЦИТОНІНУ МЕТОДОМ ІФА

Procalcitonin (PCT) Test System

Кат. №: 9225-300А

Дата випуску інструкції: 06-11-2023

Версія: 2



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

1.0 ВВЕДЕННЯ

Призначення: Кількісне визначення концентрації Прокальцитоніну в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

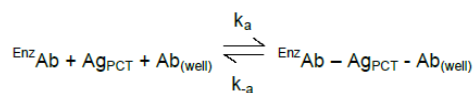
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (ТИП 10):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають, в надлишку, високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і іммобілізовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок відбувається іммобілізація через взаємодію х-РСТ антитіл, нанесених в лунці.

При змішуванні ферментно-міченого антитіла і сироватки, що містить нативний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція, без конкуренції або стеричних перешкод, з утворенням сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



де $\text{Ab}_{(\text{well})}$ = антитіла, нанесені в лунку (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{ПРОКАЛЬЦИТОНІНУ}}$ = нативний антиген (змінна кількість)

EnzAb = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{ПРОКАЛЬЦИТОНІНУ}} - \text{Ab}_{(\text{well})}$ = сендвіч-комплекс антиген-антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Після необхідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антиген-антитіло відокремлюється від не пов'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

- A. Калібратори Прокальцитоніну - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізовані)**
6 флаконів референсної сироватки (стандартів) з концентраціями Прокальцитоніну 0 (A), 0,5 (B), 1,0 (C), 2,5 (D), 10 (E) і 25 (F) нг/мл (ng/ml). Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Розведені калібратори стабільні протягом 2 днів при 2-8 °C (°C). Містять консерванти. Зберігати висушені калібратори при 2-8 °C (°C). Для довшого зберігання після розведення аліквотуйте та заморозте (< -20 °C (°C)) маленькі порції на термін до 3 місяців.
- B. Контроль Прокальцитоніну - 1.0 мл (мл)/флакон (ліофілізований)**
1 флакон контролю з концентрацією 3-5 нг/мл (ng/ml). Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Розведені калібратори стабільні протягом 2 днів при 2-8 °C (°C). Містять консерванти. Зберігати висушені калібратори при 2-8 °C (°C). Для довшого зберігання після розведення аліквотуйте та заморозте (< -20 °C (°C)) маленькі порції на термін до 3 місяців.

- C. Ферментний реагент Прокальцитоніну - 6 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить кон'югат мишачих IgG з анти-РСТ пероксидазо хрому в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- D. Планшет з нанесеним Прокальцитоніном - 96 лунок**
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антитілами до Прокальцитоніну і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C)
- E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- F. Реагент субстрату - 12 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон**
Один флакон, що містить сильну кислоту (H₂SO₄). Зберігати при 2-8 °C (°C).
- H. Інструкція**

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникайте впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 50 і 100 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in vitro

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров, сироватка або плазма. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки для венепункції з червоним ковпачком (з чи без добавок) без антикоагулянтів або вакуумні пробірки, що містять ЕДТА чи гепарин. Дозвольте крові згорнутися для зразків сироватки. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу. Зразки повинні бути аналізовані протягом 3-6 годин після забору. Якщо ні, зразки можуть зберігатися при < -20 °C (°C) до 30 днів. Не використовувати забруднені прилади. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях низького, середнього та високого діапазонів кривої відповідності дози для контролю ефективності аналізу. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення

від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розведіть концентрат розчину для промивання до 1000 мл (мл) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 50 мкл (μl) відповідного калібратора Прокальцитоніну, контролю або зразків у відповідні лунки.
- Додайте по 50 мкл (μl) ферментного реагенту Прокальцитоніну у кожен лунку.
- Перемішайте (Примітка 2) вміст лунок протягом 20-30 секунд до однорідності.
- Накрийте і інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка-дозатор, наповніть кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ (НЕ ПЕРЕМІШУЙТЕ) ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка 1: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

Примітка 2: Цикл (початок і зупинка) змішування (4 цикли) протягом 5-8 секунд/цикл є більш ефективним, ніж один безперервний (20-30 секунд) цикл для досягнення однорідності. Для виконання циклу змішування можна використовувати змішувач для планшета.

Примітка 3: Дуже важливим є піпетування точної кількості з використанням каліброваної піпетки, з внесенням близько до дна лунки та під кутом, торкаючись сторони лунки.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Прокальцитоніну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Прокальцитоніну в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Прокальцитоніну в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 2.168 перетинає стандартну криву при 15.3 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1).

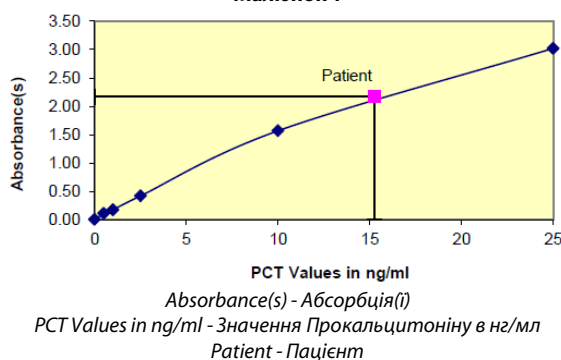
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для обробки даних, розроблене для аналізу ІФА, також може використовуватися для зменшення даних. Якщо використовується таке програмне забезпечення, слід провести перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	0.009	0.009	0
	B1	0.009		
Калібратор В	C1	0.123	0.112	0.5
	D1	0.101		
Калібратор С	E1	0.183	0.181	1.0
	F1	0.178		
Калібратор D	G1	0.430	0.423	2.5
	H1	0.416		
Калібратор E	A2	1.602	1.569	10
	B2	1.536		
Калібратор F	C2	3.015	3.019	25
	D2	3.023		
Пацієнт 1	A3	2.188	2.168	15.3
	A4	2.148		

* Дані, наведені вище і малюнок нижче показані тільки для прикладу. Не використовувати для розрахунку результатів.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F» 25 нг/мл (ng/ml)) ≥ 1.3
- Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.

- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Рівні Прокальцитоніну зростають при важкості захворювання. Значення нижче 0.5 нг/мл (ng/ml) репрезентують низький ризик сепсису або септичного шоку. Значення вище 2.00 нг/мл (ng/ml) вказують на високий ризик сепсису або септичного шоку.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Прокальцитонін виявляється протягом 3-6 годин після бактеріальної інфекції. Збільшення концентрації безпосередньо пов'язане з тяжкістю інфекції. Значення, менші ніж 0.25 нг/мл (ng/ml), очікуються для здорової популяції. Використання для моніторингу ефективності лікування добре зарекомендувало себе.

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції «нормальних» людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність набору для визначення Прокальцитоніну всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі

Сироватка	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	0.18	0.014	7.7
Рівень 2	10	1.2	0.060	5.0
Рівень 3	10	11.5	0.956	8.3

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами

Сироватка	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	0.17	0.18	10.7
Рівень 2	10	1.31	0.11	8.4
Рівень 3	10	12.2	1.04	8.5

14.2 Чутливість

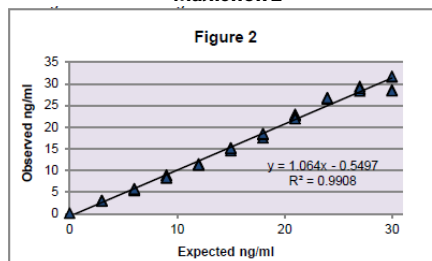
Межа бланка (LoB) становить 0.024 нг/мл (ng/ml). Межа виявлення (LoD) становить 0.05 нг/мл (ng/ml).

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність тест-системи PCT Accubind® ІФА перевіряли шляхом розведення зразків сироватки людини з високим рівнем Прокальцитоніну зразками сироватки крові людини з низьким рівнем Прокальцитоніну (<0.1 нг/мл (ng/ml)). Система забезпечує чудову лінійність у діапазоні тесту до 30.0 нг/мл (ng/ml), як показано на малюнку 2.

Малюнок 2



Observed ng/ml - Спостережувані нг/мл
Expected ng/ml - Очікувані нг/мл

14.3.2 Відновлення

Відновлення тест-системи PCT AccuBind® Мікропланшет ІФА було розраховано для п'яти зразків пацієнтів, доданих 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 і 20.0 нг/мл (ng/ml) Прокальцитоніну. Було визначено, що вихідні значення знаходяться в межах 15% від очікуваних значень для всіх зразків.

14.4 Перехресна реактивність

Наступні аналіти були протестовані та визнані неактивними.

Аналіт	Концентрація	% Реактивність
Кальцитонін	10 нг/мл (ng/ml)	<0.001
Катакальцин	25 нг/мл (ng/ml)	<0.001
a-CGRP	30 нг/мл (ng/ml)	<0.001
b-CGRP	30 нг/мл (ng/ml)	<0.001



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поїнт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

