

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ КАЛЬЦИТОНІНУ

9325-300, Calcitonin Test System

Каталог. №: 9325-300

Дата випуску інструкції: 05-03-2019

Кількість : 96

Версія 0

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

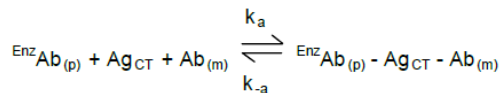
Призначення використання: Кількісне визначення концентрації кальцитоніну в сироватці крові людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод рівноваги типу сендвіч (Тип 2):

Імуноаналіз кальцитоніну - це адаптований двосайтовий ІФА типу сендвіч. У цьому аналізі стандарти та зразки пацієнтів одночасно інкубують з міченим ферментом антитілом виявлення та антитілом захоплення, пов'язаного з біотином зв'язку в лунці з покриттям мікропланшета. По закінченні інкубаційного кроку мікролунку промивають для видалення незв'язаних компонентів, а фермент, зв'язаний з твердою фазою, інкубують із субстратом, тетраметилбензидином (ТМВ). Потім для зупинки реакції додають кислий стоп-розчин, який перетворює колір у жовтий. Інтенсивність жовтого кольору прямо пропорційна концентрації кальцитоніну у зразку. Стандарти використовуються для формування кривої реакції на дозу одиниці поглинання порівняно з концентрацією. Концентрації кальцитоніну, присутні у контролі та зразках пацієнтів, визначаються безпосередньо з цієї кривої. Основні реагенти, необхідні для аналізу методом рівноваги типу сендвіч, включають антитіла з високою спорідненістю та специфічністю (передача сигналу та захоплення) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та природний антиген. У цій процедурі калібратор, контрольний зразок або зразок пацієнта додають до лунок, покритих антикальцитоніновим антитілом. Кальцитонін із зразка зв'язується з антикальцитоніном (МоАб) у лунках. Згодом у лунки додають фермент, мічений антикальцитоніном. Кальцитонін із зразка утворює сендвіч між двома антитілами. Надлишок ферменту та зразка видалається за допомогою етапу промивання. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{(m)}$ = Антикальцитонін (МоАб) (надмірна кількість у мікролунках)

Ag_{CT} = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(CT)}$ = Мічений ферментом мишачий а СТ (Р) (надмірна кількість)

$\text{EnzAb}_{(CT)} - \text{Ag}_{\text{CT}} - \text{Ab}_{(m)}$ = Аг-антитіла сендвіч-комплекс

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, прямо пропорційна концентрації нативного антигену. За допомогою декількох різних сироваткових еталонів відомих значень антигену може бути сформована крива реакції на дозу, з якої можна встановити невідому концентрацію антигену.

У лунки додають відповідний субстрат для отримання кольору з різною інтенсивністю в залежності від концентрації кальцитоніну в лунках. Інтенсивність забарвлення у зразку можна візуально порівняти з відомими калібраторами для отримання якісних результатів або розвиток кольору

можна прочитати за допомогою мікропланшетного спектрофотометра для отримання напів-напівкількісних результатів.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Кальцитоніну – 1.0 мл/флакон (сухі)

6 флаконів референсного матеріалу для кальцитоніну з рівнями 0 (A), 10 (B), 40 (C), 150 (D), 400 (E) і 1000 (F) пг/мл. Зберігати при 2-8 °C. **Розвести вміст кожного флакона з 1 мл дистильованої або деіонізованої води.** Розведені калібратори стабільні протягом 1 години при 2-8 °C. Додано консервант. Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аліквотуйте на менші порції і заморозте (<-20 °C) до 3 місяців. Цикли заморожування та розморожування слід мінімізувати до одного разу.

B. Контроль М Кальцитоніну - 1 мл/флакон (сухий)

Один (1) флакон референсного контролю для Кальцитоніну. Зберігати при температурі 2-8 °C. **Розвести вміст кожного флакона з 1 мл дистильованої або деіонізованої води.** Відновлений контроль слід аналізувати негайно після відновлення. Додано консервант. Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аліквотуйте на менші порції і заморозте (<-20 °C) до 3 місяців. Цикли заморожування та розморожування слід мінімізувати до одного разу.

C. Ферментний реагент Кальцитоніну - 6 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить стрептавідин-HRP (пероксидазу хрому) у білковому буфері та нертутий консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

D. Пластина, покрита антитілом РСТ - 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий антитілом до Прокальцитоніну та упакований в алюмінієвий пакет з сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

E. Концентрат промивного розчину - 20 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сурфактант у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

F. Субстрат - 12 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМВ) і перекис водню (0.5M H₂O₂) у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.

G. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5M H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-8 °C.

H. Інструкція щодо продукту.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Не піддавайте реактиви впливу тепла, сонця або сильного світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. Стабільність набору та компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Піпетка здатна подавати обсяги 0.050 мл (50 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.050 мл (50 мкл), 0.100 мл (100 мкл) та 0.350 мл (350 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки 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 отримано негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV 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, NHS.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками повинна бути сироватка крові за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в звичайну пробірку з червоним ковпачком для венепункції без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразок (и) не вдається проаналізувати протягом цього часу, зразок (зразки) можуть зберігатися при температурі -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу в двох примірниках потрібно 0.100 мл (100 мкл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях у низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу результатів 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

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

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

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

1. Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C.
2. Внесіть по 0.050 мл (50 мкл) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
3. Додайте 0.050 мл (50 мкл) ферментного реагенту в кожен лунку. Дуже важливо вносити всі реагенти поблизу дна лунки з покриттям.
4. Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати (500 - 600 об/хв) і накрийте.
5. Інкубуйте 60 хвилин (1 годину) при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
7. Додайте 350 мкл 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 гнучка пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте 0.100 мл (100 мкл) Субстратного Реагенту у всі лунки. **Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
10. Додайте 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожен лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 630 нм). Виміри

повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка 1: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 1000 пг/мл слід проводити розведення.

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

Примітка 3: Цикл (пуск 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 циклів змішування можна використовувати планшетний змішувач.

Примітка 4: Надзвичайно важливо точно розподілити правильний об'єм за допомогою каліброваної піпетки та додаючи біля нижньої частини мікролунок під кутом, торкаючись бічної частини лунки.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Кальцитоніну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть поглинання, отримані з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
2. Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації Кальцитоніну в пг/мл на лінійному міліметровому папері.
3. Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
4. Щоб визначити концентрацію кальцитоніну для невідомого, знайдіть середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитайте концентрацію (у пг/мл) з горизонтальної осі графіку (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено).

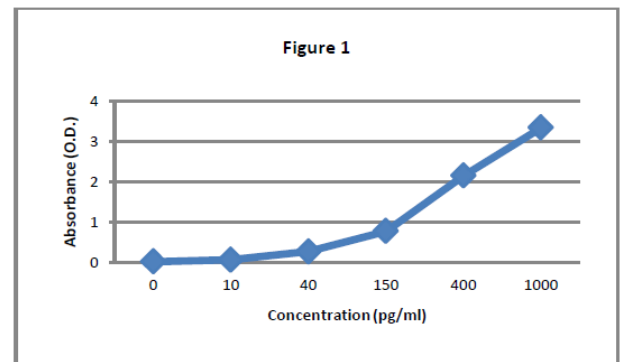
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ELISA, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

ID Зразка	Концентрація (пг/мл)	Середнє абсорбції
Калібратор А	0	0.016
Калібратор В	10	0.062
Калібратор С	40	0.268
Калібратор D	150	0.772
Калібратор E	400	2.150
Калібратор F	1000	3.347
Контроль М	80	0.365

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

Малюнок 1



*Якщо показник поглинання є незначним або вищим за середнє поглинання найвищого калібратора, зразок слід повторити з розведенням.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Абсорбція (OD) калібратора F (1000 пг/мл) повинна бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести пулів контролю якості повинні знаходитись у встановлених межах.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

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

12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. 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.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. 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.
12. Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. 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.
4. Для дійсних результатів випробувань адекватні контролю і інші параметри повинні відповідати переліченим діапазорам та вимогам до аналізу.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірною.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Набір ІФА для кальцитоніну не виявляє ефекту підвищеної дози з використанням зразків з додаванням 1000000 пг/мл кальцитоніну. Однак зразки з рівнем кальцитоніну, що перевищує найвищий калібрувальний, слід розбавляти та повторно аналізувати для отримання правильних значень.

13.0 ДІАПАЗОНИ ОЧІКУВАНИХ ЗНАЧЕНЬ

Рівні кальцитоніну вимірювали у тридцяти одній (31), ймовірно, нормальної людини. Отримані значення коливались від 0.292 до 118.643 пг/мл. На основі статистичних тестів на зсув та ексцес, популяція, перетворюючись логарифмічно, дотримується нормального або Гауссового розподілу, як показано на гістограмах. Середнє геометричне значення ± 2 стандартних відхилення середнього значення було розраховано від 4.49 до 41.83 пг/мл. Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для популяції "нормальних" людей, залежить від

безлічі факторів: специфіки методу, сукупності тестованого населення та точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність вимірювання всередині та між тестами тест-системи Calcitonin AccuBind® ELISA визначали шляхом аналізу трьох пулів різних рівнів контрольних сироваток. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення (σ) та коефіцієнт варіації (C.V.) кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 1 та таблиці 2.

ТАБЛИЦЯ 1
Точність в межах аналізу (значення в пг/мл)

Зразок	N	X	σ	C.V.
Низький	20	26.23	2.58	9.9
Нормальний	20	65.50	3.67	5.57
Високий	20	318.101	7.88	2.51

ТАБЛИЦЯ 2
Точність між аналізами (значення в пг/мл)

Зразок	N	X	σ	C.V.
Низький	20	26.03	3.81	14.62
Нормальний	20	65.97	12.24	18.55
Високий	20	313.73	31.02	9.89

14.2 Чутливість

Тестова система Calcitonin AccuBind® ELISA має чутливість 4.4871 пг/мл. Чутливість визначали на основі мінімальності калібруатора сироватки 0 нг/мл та використовуючи статистику 2σ (95% достовірність) для розрахунку мінімальної дози.



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

