



Набор для определения КАЛЬЦИТОНИНА

Кат. № : 106-3648
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 29-05-2007

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного измерения кальцитонина в сыворотке. Данный анализ предназначен для измерения *in vitro*.

СУММИРОВАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Кальцитонин является полипептидом 32-аминокислоты, первично синтезируется в парафолликулярных С-клетках щитовидной железы. Его основная биологическая роль заключается в ингибировании резорбции остеокластов кости. Это свойство ведет к использованию кальцитонина при заболеваниях, что характеризуются увеличением резорбции, как болезнь Паджета, для некоторых пациентов с остеопорозом.

КЛИНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

Наиболее известный клинический синдром, связанной с нарушением гиперсекреции кальцитонина, является медуллярная карцинома щитовидной железы. (МТС). МТС является опухолью С-клеток, вырабатываемых щитовидной железой. Хотя МТС является редким, 5-10% всех тироидных канцером, он очень часто является фатальным. Он может быть случайным или иметь родственную форму, что распространяется как аутосомальная доминантная черта. МТС имеет важное клиническое значение через его семейное распространение. Он диагностируется на ранней стадии кальцитонином сыворотки и возможно полное излечение ранней субклинической болезни. Он часто ассоциируется с другими клиническими чертами и имеет хороший потенциал для хирургического излечения. Хотя опухоль бывает не часто, она может иметь родственную форму. Как тип II множинной эндокринной неоплазии. Эти опухоли обычно вырабатывают диагностически повышенную концентрацию кальцитонина в сыворотке. Поэтому, иммуноферментный анализ кльцитонина в сыворотке может использоваться для диагностики наличия МТС с исключительной степенью точности и специфичности. В небольшом, но возрастающем, проценте пациентов основной уровень гормонов не отличается от нормы. Некоторые из этих субъектов представляют раннюю стадию неоплазии С-клеток или гиперплазии, что является наиболее податливым хирургическому лечению. Для идентификации этих пациентов при ранней болезни, провокативный тест на секрецию кальцитонина необходим для устранения фальшиво отрицательных результатов, если только проводится основное определение кальцитонина. Большинство опухолей при повышенном уровне кальцитонина отвечают на прием или кальция или pentagastrin или их комбинации, но такие агенты могут дать обманчивые результаты. Поэтому в случае клинического проявления, эти агенты должны приниматься во внимание при диагностическом тесте. Более того, измерение кальцитонина также может использоваться для изучения эффективности терапии пациентов с кальцитонин вырабатываемой опухолью. Описано, что многие формы иммунореактивного кальцитонина обнаружены и в здоровых субъектах, и в пациентах с МТС. Эти разные формы кальцитонина имеют молекулярный вес от 3400 (мономерический) до 70000 Дальтон (полимерический). Неопластические болезни других нейроэндокринных клеток могут также повышать кальцитонин. Наиболее простым примером является рак малых клеток легких. Другие опухоли как карциномы и опухоли островковых клеток поджелудочной железы также повышает уровень кальцитонина в сыворотке. Повышенный уровень кальцитонина в сыворотке также замечен при острой и хронической почечной недостаточности, гиперкальциемии и гиперкальциемии.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный набор является двухстадийным ELISA для измерения биологической интактной цепи 32 аминокислоты кальцитонина. Он использует два разные мышинные моноклональные антитела к человеческому кальцитонину, специфическому к молекуле кальцитонина на ячейке. Одно антитело связывается только с кальцитонином 11-23 и это антитело является биотинальное. Другое антитело связывается только с кальцитонином 21-32 и это антитело есть меченное пероксидазой хрена для определения. См. оригинал инструкции

В этом анализе калибраторы, контроли или образцы пациентов одновременно инкубируются с энзимно-меченным антителом и биотин парным антителом в стрептавидин-привитой ячейке микропланшета. Таким образом, кальцитонин в образце будет в «сандвиче» между двумя антителами. В конце инкубации микроячейки промываются для удаления несвязанного содержимого и привитый энзим к солидной фазе инкубируется с субстратом, ТМВ. Потом добавляется кислый стоп

раствор для остановки реакции и обращает цвет на желтый. Интенсивность желтого цвета прямо пропорциональна количеству кальцитонина в образце. Строится кривая единиц абсорбции против концентрации, используя результаты, полученные для калибраторов. Концентрация кальцитонина в контроле и образцах пациента определяется на кривой.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

НЕ смотря на то, что реагенты, поставляемые в наборе не содержат человеческой крови, человечески образцы могут быть позитивные на антитела HBsAg, HBcAg, или HIV1 с ними нужно работать, считая опасными. Нужно использовать общи правила как и при работе с какими либо другими нетестированными образцами пациента. Стоп раствор содержит 1N серную кислоту. Это сильная кислота. Даже разбавленная она должна использоваться осторожно. Она может вызывать ожег, поэтому при работе с ней используйте перчатки, защиту для глаз и защитную одежду. При выливании, промойте большим количеством воды. Не вдыхайте испарения.

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Смотрите таблицу 1.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный ридер, способный измерять абсорбцию при длине волны 450 нм и 405 нм.
- Микропланшетный вошер (если вошер не доступен, возможно ручное промывание)
- Точные пипетки для внесения 50, 100 и 150 мкл.
- (необязательно) Многоканальный диспенсер или многоразовый диспенсер на 50, 100 и 150 мкл.

СБОР И ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ

Определение кальцитонина должно проводится в сыворотке. Для анализа в дубле необходимо 200 мкл сыворотки. Соберите цельную кровь без антикоагулянтов. После того как кровь сгустилась, необходимо немедленно отделить сыворотку, желательно в охлажденной центрифуге и хранить при -20°C или ниже. Избегайте сильно гемолизованных и сильно липемических образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните все содержимое набора при $2-8^{\circ}\text{C}$ до начала анализа, кроме моющего концентрата и стоп раствора.

- Все реагенты, кроме калибраторов, контролей и моющего концентрата готовы к использованию. Храните все реагенты при $2-8^{\circ}\text{C}$, кроме моющего концентрата, который должен храниться при комнатной температуре до разбавления для предотвращения осада.
- Разведите калибратор А (нулевой стандарт) 2,0 мл дистиллированной или деионизированной водой и перемешайте. Для каждого ненулевого калибратора (калибраторы В-Ф) и контролей 1 и 2, разведите каждый флакон 1,0 мл реагента 3 (раствор для разведения) и перемешайте. Выдержите флаконы 10 минут, а потом смешайте тщательно легкими вращениями до полного растворения. Используйте калибраторы и контроли как можно быстрее после растворения. Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования, не используйте само размораживающую систему. Стандарты и контроли стабильны при -20°C 6 недель после разведения, возможно до трех циклов замораживания / оттаивания.
- ELISA реагент А: Моющий концентрат: смешайте содержимое моющего концентрата аккуратно. Если есть осад через хранение при низкой температуре, растворите его в водяной бане при 37°C или вращая его. Добавьте моющий концентрат (30 мл) в 570 мл дистиллированного или деионизированной воды. Разбавленный моющий раствор стабилен 90 дней при хранении при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Кальцитонин 1-32 является очень неустойчивой молекулой. Проводите анализ немедленно после разведения или оттаивания всех калибраторов, контролей или образцов пациента.
- Рекомендуется анализ калибраторов, контролей и образцов в дубле. Средние единицы абсорбции дублей должны использоваться для уменьшения данных и вычисления результатов.
- Образцы должны пипетироваться в ячейки при минимальном образовании пузырей. Для достижения этого «вращайте пипетку» как описано в инструкции производителя пипеток.
- Образцы пациентов со значением выше наивысшего калибратора (калибратора F), что равна приблизительно 1000 пг/мл (точная концентрация указана на этикетке флакона), могут быть разбавлены калибратором А (нулевым калибратором) и проанализированы повторно. Умножьте результаты на фактор разбавления.
- Не меняйте реагенты разных лотов.
- Если можно, смешайте в равных объемах в достаточном количестве для анализа, реагент 1 (биотинальное антитело) и реагент 2 (энзимно-меченное антитело) в чистой янтарной бутылке. Скобинированный реагент стабилен 7 дней при 4°C . Потом используйте 100 мкл смешанного антитела для каждой ячейки. Этот

альтернативный метод заменяет шаг 3 и 4, потом инкубируйте на орбитальном шейкере.

- При смешивании избегайте выливания. Это влияет на точность и достоверность анализа.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Поместите необходимое количество стрипов, покрытых стрептавидином в держатель для анализа 6 калибраторов (точная концентрация указана на флаконе), сыворотки контроля качества и образцов пациента.
- Пипетируйте 100 мкл образца в указанные ячейки. **Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования, не используйте само размораживающую систему.**
- Внесите 50 мкл реагента 1 (биотинальное антитело) в каждую ячейку, что уже содержит образец.
- Внесите 50 мкл реагента 2 (энзимно-меченное антитело) в каждую из этих ячеек.
- Накройте микропланшет алюминиевой фольгой или избегайте попадания света и поместите их на орбитальный шейкер или ротатор при 170+10 гр/м на 4 часа + 30 минут при комнатной температуре (22-28°C).
- Сначала аспирируйте жидкость полностью, а потом промойте / аспирируйте каждую ячейку 5 раз рабочим моющим раствором (приготовленным из реагента А), используя автоматический микропланшетный вошер. Объем моющего раствора должен быть установлен для внесения 0,35 мл в каждую ячейку.
- Добавьте 150 мкл ELISA реагент В (ТМВ субстрат) в каждую ячейку.
- При необходимом накрытии для предотвращения попадания света, поместите микропланшет на орбитальный шейкер или ротатор, установленный при 170+10 гр/м на 30+5 минут при комнатной температуре (22-28°C).
- Добавьте 100 мкл стоп раствора в каждую ячейку. Тщательно перемешайте.
- Считайте абсорбцию раствора в ячейках в течении 10 минут, используя микропланшетный ридер при 450 нм против 250 мкл дистиллированной или деионизированной воды. Считайте планшет против ридера при 405 нм против дистиллированной или деионизированной воды.

Примечание: Второе считывание предназначено для установки аналитической оценки калибровочной кривой для величины, представленной наивысшим калибратором, равным приблизительно 1000 пг/мл. Следовательно, образцы пациентов с уровнем кальцитонина > 300 пг/мл могут быть вычислены на калибровочной кривой, что содержит считывания до концентрации равной наивысшему калибратору, что используется при 405 нм считывании, от длины волны максимальной абсорбции. В основном, образцы пациентов и контроли должны считываться при использовании считывания при 450 нм для концентрации кальцитонина до 300 пг/мл. Концентрация кальцитонина выше 300 пг/мл должна интерполироваться, используя 405 нм считывание.

11. При использовании конечной абсорбции, полученной в предварительном шаге, постройте калибровочную кривую через кубический сплайн, 4 параметровую логистику, интерполяцию от точки до точки для количественного определения кальцитонина.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ручной метод

- Для 450 нм считывания, постройте кривую, используя первые пять калибраторов, например калибраторы А, В, С, D, и Е. Для 405 нм считывания, постройте вторую стандартную кривую, используя три калибратора с наивысшей концентрацией, например калибраторы D, Е, и F.
- Пометьте концентрацию каждого калибратора, указанные на флаконе в пг/мл. Отложите данные калибровочной кривой на линейной бумаге при концентрации на оси X и соответствующей абсорбции на оси Y.
- Нарисуйте прямую линию между двумя смежными точками. Этот математический алгоритм широко известный как вычисление от точки к точке. Получите концентрацию образца откладывая единицы абсорбции на оси Y и найдите соответствующие концентрации на оси X. Образцы пациентов и контроли должны считываться при 450 нм для концентрации кальцитонина до 300 пг/мл. Концентрация кальцитонина выше 300 пг/мл должна интерполироваться при 405 нм.

Автоматический метод

Хорошие результаты дают компьютерные программы кубического сплина или 4 параметровой логистики или от точки к точке.

Данные образцов при 450 нм (необработанный А.У. считывание против дистиллированной или деионизированной воды) смотрите таблицу 2. Данные образцов при 405 нм (необработанный А.У. считывание против дистиллированной или деионизированной воды) смотрите таблицу 3.

Примечание: Представленные данные только для иллюстрации и не должны использоваться как результаты анализа.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольная сыворотка должна использоваться при каждом анализе. Результаты, полученные при анализе контролей, должны оцениваться при использовании подходящего статистического метода. Результаты

анализа, в котором значения контролей находятся за допустимыми границами считаются недостоверными.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор не показывает побочных эффектов с образцами, обогащенными 1000000 пг/мл чистого интактного кальцитонина (1-32). Обогащенный образец дал результат выше, чем наивысший стандарт, т.е. 1000 пг/мл. Образцы с уровнем кальцитонина выше, чем наивысший калибратор, однако, должны быть разбавлены и повторно проанализированы для получения корректных величин. Как и другие аналиты, что используются как диагностические приложения, результаты кальцитонина должны интерпретироваться с осторожностью при соответствии с клинической картиной и другими тестами.

Корректные результаты будут получены только при полном понимании процедуры проведения анализа и инструкции.

Очень важна процедура промывания. Недостаточное промывание влияет на получение точных результатов.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Рекомендуется, что каждая лаборатория устанавливала собственные установленные границы. Представленные данные должны использоваться как руководящие. Уровень кальцитонина был вычислен в 59 очевидно здоровых женщин и 52 очевидно здоровых мужчин данным набором. Значения, полученные для очевидно здоровых женщин, находятся в диапазоне 0,1-10,9 пг/мл и значения, полученные для очевидно здоровых мужчин, находятся в диапазоне 0,2-27,7 пг/мл. Основываясь на статистических тестах асимметрии и эксцесса популяции при логарифмическом перенесении, следовало здоровое распределение или распределение Гуссена, как показано в гистограмме. Геометрическое среднее \pm 2 стандартных отклонений средних для здоровых женщин было вычислено 0,07 – 12,97 пг/мл и 0,68 – 30,26 пг/мл для здоровых мужчин. Как показано в литературе, уровень кальцитонина обнаружен в здоровых женщин ниже, чем в здоровых мужчин. Отсюда, установленный диапазон должен быть меньше чем 13 и 30 пг/мл для женщин и мужчин, соответственно.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Достоверность

77 образцов пациентов со значениями кальцитонина в диапазоне от 0,8 – 3113 пг/мл были проанализированы DRG ELISA процедурой и IRMA набором. Линейная регрессия дала следующую статистику:

$$\text{DRG ELISA} = 0.940 \text{ IRMA набор} + 6,55 \text{ пг/мл}$$

$$r = 0.993 \quad N = 123$$

Дальше 51 образец пациента в границах от <0,7 до 2240 пг/мл был проанализирован DRG ELISA и ICMA набором. Анализ линейной регрессии дал следующую статистику:

$$\text{DRG ELISA} = 1.094 \text{ ICMA набор} - 6,13 \text{ пг/мл}$$

$$r = 0.995 \quad N = 123$$

Чувствительность

Чувствительность или минимально определяемый лимит этого анализа определяется как наименьшее одно значение, которое может быть установлено из нуля при 95% доверительном лимите. DRG кальцитонин ELISA имеет чувствительность 1,0 пг/мл.

Точность и восстановление

Точность данного анализа была вычислена из 20 повторных определений для каждого из трех образцов.

Внутри тестовая точность

Образец	Среднее значение (пг/мл)	n	КВ, %
A	24,3	20	5,7
B	94,9	20	4,3
C	403	20	2,8

Общая точность данного анализа была вычислена исходя из данных трех образцов, полученных в 15 разных анализах, с реагентами трех разных лотов, за трехнедельный период.

Между тестовая точность

Образец	Среднее значение (пг/мл)	n	КВ, %
A	16,5	15	7,4
B	64,5	15	7,4
C	340	15	6,1

Восстановление

Разное количество кальцитонина было добавлено к четырем разным сывороткам пациента для определения восстановления. Результаты показаны в таблице стр. 9.

Специфичность и перекрестная реактивность

Смотрите таблицу 5.

Каждый перекрестный реактант был добавлен в образец, содержащий кальцитонин. Уровень кальцитонина измерялся до и после добавления. Нет перекрестных реактантов, влияющих на DRG кальцитонин ELISA. Небольшие изменения измеряемого кальцитонина находятся в границах статистики внутри тестовой точности.

Кинетический эффект анализа

Для определения есть ли систематический кинетический эффект между началом теста и окончанием, три обогащенных сыворотки пациентов, выбранных для представления перекрестной секции концентрации кальцитонина, проанализировали через весь планшет или 96 ячеек.

Линейность разбавления образцов пациента: параллелизм

Шесть образцов пациента были разбавлены калибратором А (нулевым калибратором). Результаты в пг/мл показаны в таблице 6.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: +38 (0342) 77 51 22
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com

Таблица 1

Содержимое набора	Описание	Количество
Реагент 1	Биотинальное антитело кальцитонина	1x7.0 мл
Реагент 2	Антитело кальцитонина, меченное пероксидазой (энзимом)	1x7.0 мл
Реагент 3	Разведенный раствор, содержащий EDTA	1x10 мл
Реагент А	ELISA моющий концентрат (солевой раствор с поверхностно активным веществом)	1x30 мл
Реагент В	TMB субстрат	1x20 мл
Стоп раствор	ELISA стоп раствор (1N серная кислота)	1x20 мл
Микропланшет	Один держатель с стрипами, покрытыми стрептавидимом	12x8-ячейковых стрипов
Калибраторы А: 0 пг/мл В: С: D: E: F:	Лиофилизированный синтетический h-Кальцитонин. Лиофилизированный нулевой калибратор (BSA раствор). Другие калибраторы содержат синтетический h-кальцитонин (1-32) в BSA растворе, калиброванные к WHO 2 nd IS 89/620	1x2 мл нулевого калибратора 1x1 мл всех других калибраторов
Контроли 1 и 2	Лиофилизированные. 2 уровни. Синтетический h-кальцитонин (1-32) в BSA растворе	1x1 мл на фл

Таблица 2

Ячейки микропланшета	Абсорбция 1-го считывания, единицы	Абсорбция 2-го считывания, единицы	Средняя абсорбция, единицы	Кальцитонин, пг/мл	Кальцитонин пг/мл – результаты для отчета
Калибратор А	0,008	0,009	0,0085		0
Калибратор В	0,059	0,064	0,0615		10
Калибратор С	0,186	0,194	0,190		30
Калибратор D	0,578	0,602	0,590		100
Калибратор E	1,900	1,882	1,891		300
Контроль 1	0,127	0,122	0,125	20,6	20,6
Контроль 2	2,554	2,565	2,560	>300	*
Образец 1	0,034	0,040	0,037	4,7	4,7
Образец 2	0,104	0,098	0,101	16,3	16,3
Образец 3	0,397	0,411	0,404	68,7	68,7
Образец 4	2,195	2,173	2,184	>300	*

*Поскольку считанная концентрация >300 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 405 нм, как показано в таблице данных при 405 нм.

Таблица 3

Ячейки микропланшета	Абсорбция 1-го считывания, единицы	Абсорбция 2-го считывания, единицы	Средняя абсорбция, единицы	Кальцитонин, пг/мл	Кальцитонин пг/мл – результаты для отчета
Калибратор А	0,005	0,005	0,005		0

Калибратор D	0,187	0,198	0,193		100
Калибратор E	0,602	0,597	0,599		300
Калибратор F	1,898	1,910	1,904		1000
Контроль 1	0,045	0,044	0,045	<300	¶
Контроль 2	0,814	0,816	,815	403	403
Образец 1	0,016	0,020	0,018	<300	¶
Образец 2	0,039	0,035	0,037	<300	¶
Образец 3	0,128	0,134	0,131	<300	¶
Образец 4	0,697	0,689	0,693	345	345

¶ Для образцов при считывании <300 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 450 нм, как показано в таблице данных при 450 нм. Эта практика даст результаты с оптимальной чувствительностью.

Таблица 4

Образец сыворотки	Эндогенный кальцитонин (пг/мл)	Кальцитонин добавленный (пг/мл)	Ожидаемая величина (пг/мл)	Измеряемая величина (пг/мл)	Восстановление (%)
A	0	--	--	--	--
	0	100	100	110	110
	0	200	200	217	109
B	9,7	--	--	--	--
	8,7	100	109	106	97
	7,8	200	208	207	100
C	0	--	--	--	--
	0	100	100	104	104
	0	200	200	205	103
D	5,7	--	--	--	--
	5,1	126	131	119	91
	4,6	220	225	203	90

Таблица 5

Перекрестный реагент	Концентрация перекрестного реагента	Кальцитонин без перекрестного реагента (пг/мл)	Кальцитонин с перекрестным реагентом (пг/мл)	Изменение кальцитонина (пг/мл)	% перекрестной реактивности
PTH (1-84)	100 000 пг/мл	186	194	8	0,00800
	30 000 пг/мл	186	200	14	0,04667
	10 000 пг/мл	186	194	8	0,08000
Кальцитонин генный	1 000 000 пг/мл	200	202	2	0,00020
	100 000 пг/мл	200	204	4	0,00400
Кальцитонин лосося	1 000 000 пг/мл	191	194	3	0,00030
	100 000 пг/мл	191	199	8	0,08000
ТТГ	5 000 мкл/мл	198	203	5	0,00061
	500 мкл/мл	198	193	0	0,00000
	50 мкл/мл	198	199	1	0,01220

Таблица 6

Образец	Разбавление	Ожидаемый	Полученный	% Полученный / Ожидаемый
A	Неразбавленный	-	343	-
	1:2	172	168	98
	1:4	85,8	81,3	95
	1:8	42,9	40,3	94
B	Неразбавленный	-	271	-
	1:2	136	131	97
	1:4	67,8	70	103
	1:8	33,9	34,3	101
C	Неразбавленный	-	265	-
	1:2	133	134	101
	1:4	66	70,4	106
	1:8	33,1	32,5	98
D	Неразбавленный	-	>1000	-
	1:2	-	1060	-
	1:4	530	504	95
	1:8	265	271	102
E	Неразбавленный	-	231	-
	1:2	116	116	100
	1:4	57,8	58,8	102
	1:8	28,9	27,1	94
F	1:16	14,4	12,1	84
	Неразбавленный	-	>1000	-
	1:2	-	997	-
	1:4	499	429	86
F	1:8	249	223	89
	1:16	125	119	95