

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОКАЛЬЦІТОНІНУ МЕТОДОМ ІХЛА

Procalcitonin (PCT) Test System

Кат. №: 9275-300A

Дата випуску інструкції: 22-05-2018

Версія: 1



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

1.0 ВВЕДЕННЯ

Призначення: Кількісне визначення концентрації Прокальцитоніну в сироватці або плазмі людини за допомогою ІФА, хемілюмінесцентного.

2.0 ВСТУП ТА ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Прокальцитонін (PCT) - це невеликий білок, що містить 116 амінокислот із приблизною молекулярною масою тринадцять (13) кіло Дальтон. Прокальцитонін, який синтезується в щитовидній залозі, є прекурсором гормону кальцитоніну (32 амінокислоти), який утворюється при розщепленні. Дві інші молекули також є продуктами реакцій розщеплення: катакальцин (21 амінокислота) і N-кінцевий прокальцитонін (57 амінокислот).

У 1993 році вперше було повідомлено, що прокальцитонін є маркером системної інфекції бактеріального походження.¹ Також було виявлено, що він дуже низький у здорових суб'єктів і лише незначно підвищується при вірусних інфекціях. Це чітке розрізнення призвело до використання його як маркера станів, що супроводжуються системним запаленням і сепсисом.

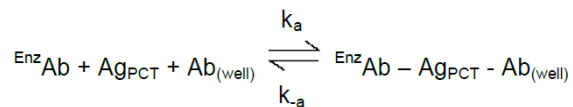
Роль прокальцитоніну у лікуванні антибіотиками при гострих респіраторних захворюваннях добре задокументована.²

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз (ТИП 10):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають високоафінні та специфічні антитіла (ферментні та іммобілізовані), з різним та чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні лунки мікропланшета шляхом взаємодії антитіла х-РСТ, нанесеного в лунку.

Після змішування міченого ферментом антитіла та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і антитілами без конкуренції чи стеричних перешкод з утворенням сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{(\text{well})}$ = Антитіло, нанесене в лунці (надлишкова кількість)

Ag_{PCT} = Нативний антиген (змінна кількість)

EnzAb = Ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

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

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

За деякий час фракцію, зв'язану з антитілом, відокремлюють від незв'язаного антигену шляхом декантації або аспірації. Активність ферменту у фракції, зв'язаній з антитілами, прямо пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних референсних зразків сироватки з відомими значеннями антигену, можна створити криву доза-відповідь, на основі якої можна встановити концентрацію антигену в невідомому зразку.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Прокальцитоніну - 1.0 мл (мл)/флакон (сухі) - позначки A-F

Шість (6) флаконів референсних калібраторів для антигена прокальцитоніну у концентраціях 0 (A), 0.5 (B), 1.0 (C), 2.5 (D), 10 (E) і 25 (F) нг/мл (ng/ml). Розчиніть кожен флакон з 1 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Відновлені калібратори стабільні протягом 2 днів при 2-8 °C (°C). Додано консервант. Сухі калібратори зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Для більш тривалого періоду після відновлення, аліквотувати на менші порції та зберігати замороженими (<-20 °C (°C)) до 3 місяців.

B. Контроль Прокальцитоніну - 1.0 мл (мл)/флакон (сухий)

Один (1) флакон контролю з концентрацією 3-5 нг/мл (ng/ml). Розчиніть кожен флакон з 1 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води. Відновлені контроли стабільні протягом 2 днів при 2-8 °C (°C). Додано консервант. Сухі контроли зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Для більш тривалого періоду після відновлення, аліквотувати на менші порції та зберігати замороженими (<-20 °C (°C)) до 3 місяців.

C. Реагент Трейсер Прокальцитоніну - 6 мл (мл)/флакон - позначка E

Один (1) флакон містить кон'югат анти-Прокальцитоніну, пероксидази хрому та мишачого IgG у буфері, барвник та консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Світлові реакційні лунки - 96 лунок - позначка Y

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антитілом х-РСТ, запакований в алюмінієвий пакет з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат Промивного розчину - 20 мл (мл) - позначка D

Один (1) флакон, що містить поверхнево-активну речовину в забуференому фізіологічному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Сигнальний реагент A - 7 мл (мл)/флакон - позначка C^A

Один (1) флакон, що містить люмінол у буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C) (див. розділ «Підготовка реагентів»).

G. Сигнальний реагент B - 7 мл (мл)/флакон - позначка C^B

Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C) (див. розділ «Підготовка реагентів»).

H. Інструкція.

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

Примітка 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору та компонентів зазначено на етикетці.

Примітка 3: Наведені вище реагенти призначені для одного 96-лункового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний доставляти об'єм 0.050 та 0.100 мл (мл) (50 та 100 мкл (μl)) з точністю вище 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних поставок об'ємів 0.100 і 0.350 мл (мл) (100 та 350 мкл (μl)) з точністю вище 1.5%.
3. Вошер для мікропланшетів або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний люмінометр.
5. Абсорбуючий папір для промокання лунок мікропланшета.
6. Поліетиленова плівка або кришка мікропланшета для етапів інкубації.
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для етапів промивання.
8. Таймер.
9. Матеріали контролю якості.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Тільки для використання в діагностиці In vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Усі продукти, що містять людську сироватку, були визнані неактивними щодо поверхневого антигену гепатиту В, ВІЛ 1 і 2 та антитіл до ВГС згідно з вимогами УПМ. Оскільки жоден відомий тест не може забезпечити повну впевненість у відсутності інфекційних агентів, усі продукти людської сироватки слід розглядати як потенційно небезпечні та здатні передавати захворювання. Належні лабораторні процедури поводження з продуктами крові можна знайти в Центрі контролю захворювань/Національному інституті здоров'я, «Біологічна безпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях», 2-е видання, 1988 р., ННС.

Безпечна утилізація компонентів набору має здійснюватися відповідно до місцевих нормативних та законодавчих вимог.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками має бути кров, сироватка або плазма за типом; слід дотримуватись звичайних запобіжних заходів для забору зразків венепункцією. Кров слід забирати у пробірку(и) для венепункції з червоним ковпачком (з гелевими добавками або без них) без антикоагулянтів або вакуумну пробірку(и), що містить ЕДТА або гепарин). Дайте крові згорнутися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку від клітин.

Зразки слід аналізувати протягом 3-6 годин після забору. Якщо ні, зразки можна зберігати при температурі < -20 °C (°C) протягом 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. При аналізі в дублях потрібно 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролю на рівнях у низькому, нормальному та високому діапазонах для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі, а значення повинні визначитися в кожній проведених процедурі тестування. Для відстеження ефективності наданих реагентів слід підтримувати карти контролю якості. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Кожна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Крім того, максимальна абсорбція повинна співпадати з результатами, отриманими в попередньому досвіді. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про непомічену зміну умов аналізу або погіршення якості реагентів набору. Щоб визначити причину відхилення, слід використовувати свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розвести вміст Промивного розчину до 1000 мл (мл) з дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігати розведений буфер при температурі 2-30 °C (°C) до 60 днів.

2. Робочий розчин Сигнального реагенту - Зберігати при 2-8 °C (°C).

Визначте необхідну кількість реагенту та приготуйте, змішавши рівні порції Сигнального реагенту А та Сигнального реагенту В у чистому контейнері. Наприклад, додайте 1 мл (мл) А та 1 мл (мл) В на два (2) 8-лункових стрипи (Розчин готується з невеликим надлишком).

Утилізуйте залишки, якщо вони не використані протягом 36 годин після змішування. Якщо очікується повне використання реагентів протягом зазначеного вище часового обмеження, вилийте вміст Сигнального реагенту В до Сигнального реагенту А та позначте відповідним чином.

9.0 ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

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

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшета для кожного референсного калібратора сироватки, контролю та зразка пацієнта для аналізу в дублях. Поверніть невикористані мікролункові стрипи назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Дозуйте 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) відповідного калібратора Прокальцитоніну, контролю або зразка у призначену лунку.
- Дозуйте 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) реагенту Трейсера Прокальцитоніну в кожну лунку.
- Перемішуйте (Примітка 3) вміст лунок мікропланшета протягом 20-30 секунд до однорідності.
- Накрийте та інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ «Підготовка реагентів»), декантуйте (постукайте та промоknіть) або аспіруйте. Повторіть ще два (2) рази, щоб загалом було три (3) промивання. Можна використовувати автоматичний або ручний вошер планшетів. Для правильного використання дотримуйтесь інструкцій виробника. Якщо використовується пляшка під тиском, заповніть кожну лунку, натиснувши на емність (уникаючи бульбашок повітря), щоб розподілити розчин. Злийте промивну рідину та повторіть ще два (2) рази.

- Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) робочого розчину сигнального реагенту в кожну лунку (див. «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності, щоб уникнути розбіжностей в часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ (ЗМІШУЙТЕ) ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СИГНАЛЬНОГО РЕАГЕНТУ

- Інкубуйте п'ять (5) хвилин при кімнатній температурі в темряві.
- Зчитайте відносні світлові одиниці (RLU) у кожній лунці протягом 0.2-1.0 секунди. Результати можна зчитувати не пізніше 30 хвилин після додавання сигнального розчину.

Примітка 1: Не використовуйте робочий розчин сигнального реагенту, якщо йому понад 36 годин.

Примітка 2: Не використовуйте забруднені реагенти або реагенти, у яких розмножуються бактерії.

Примітка 3: 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 циклів змішування можна використовувати планшетний змішувач.

Примітка 4: Надзвичайно важливо точно дозувати правильний об'єм за допомогою відкаліброваного дозатора та додавання біля дна мікролунки під кутом, торкаючись краю лунки.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Прокальцитоніну в невідомих зразках використовується крива доза-відповідь.

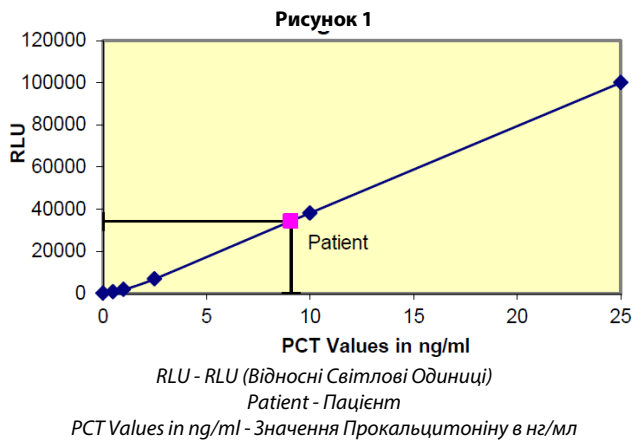
- Запишіть RLU, отримані з роздруковки пристрою для зчитування мікропланшетів, як описано в Прикладі 1.
- Відкладіть на лінійному міліметровому папері RLU для кожного дублю референсного калібратора сироватки проти відповідної концентрації Прокальцитоніну у нг/мл (ng/ml) (не слід виводити середні значення дублів референсної сироватки).
- Накресліть найкращу криву через нанесені точки.
- Щоб визначити концентрацію Прокальцитоніну для невідомого, знайдіть середні RLU для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитайте концентрацію (у нг/мл (ng/ml)) на горизонтальній осі графіка (для дублів невідомого можуть бути виведені середні значення, як зазначено). У наступному прикладі середнє RLU (34306) невідомого перетинає калібрувальну криву при концентрації Прокальцитоніну (9.074 нг/мл (ng/ml)) (див. Рисунок 1).

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

Приклад 1

I.D. Зразка	№ Лунки	RLU (A)	Середнє RLU (B)	Значення (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	265	246	0
	B1	227		
Калібратор В	C1	944	944	0.5
	D1	944		
Калібратор С	E1	1927	1912	1.0
	F1	1898		
Калібратор D	G1	7236	7000	2.5
	H1	6763		
Калібратор E	A2	38989	38234	10
	B2	37473		
Калібратор F	C2	100608	100000	25
	D2	99379		
Зразок 1	A3	33868	34306	9.074
	A4	34743		

*Дані, представлені в Прикладі 1 і на Рисунку 1, наведені лише для ілюстрації і не повинні використовуватися замість кривої дози-відповіді, підготовленої для кожного аналізу. Крім того, RLU калібраторів нормалізовано до 100000 RLU для калібратора F (найбільша світловіддача). Це перетворення мінімізує відмінності, викликані ефективністю різних приладів, які можна використовувати для вимірювання світла.



Примітка: Помножите значення, отримані з горизонтальної кривої, на 2,5, щоб конвертувати в нМ/мл (pM/ml).

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними, повинні бути виконані наступні умови:

1. Крива доза-відповідь має бути в межах встановлених параметрів.
2. Чотири з шести пулів контролю якості повинні бути в межах встановлених діапазонів.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма Сертифікату безпечності матеріалу та форма Аналізу ризиків для цього продукту доступні за запитом від Monobind Inc.

12.1 Ефективність аналізу

1. Для досягнення відтворюваних результатів важливо підтримувати постійний час реакції в кожній луці.
2. Дозування зразків не повинно тривати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу.
3. Не можна використовувати високоліпемічні, гемолізовані або сильно забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше одного (1) планшета, рекомендується повторити криву доза-відповідь.
5. Додавання розчину сигнального реагенту ініціює кінетичну реакцію, тому сигнальний реагент(и) слід додавати в тій самій послідовності, щоб усунути будь-які відхилення в часі реакції.
6. Нездатність належним чином видалити прилиплий розчин аспірацією або декантацією на стадіях промивання може призвести до погані реплікації та помилкових результатів.
7. Використовуйте компоненти з однієї партії. Не змішуйте реагенти із різних партій.
8. Точне та чітке дозування, а також дотримання встановлених вимог щодо часу та температури є важливими. Будь-яке відхилення від інструкції з використання, наданої Monobind, може дати неточні результати.
9. Необхідно суворо дотримуватися всіх застосованих національних стандартів, правил і законів, включаючи, але не обмежуючись, належні лабораторні процедури, щоб забезпечити відповідність і належне використання набору.
10. Важливо відкалібрувати все обладнання, наприклад, дозатори, зчитувачі, вошери та/або автоматизовані інструменти, які використовуються з цим набором, а також проводити планове профілактичне обслуговування.
11. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЕС щодо IVD, знак відповідності CE, щодо цього та інших наборів, виготовлених Monobind, можна запитувати електронною поштою за адресою Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись кваліфікованою особою або навченим фахівцем.
2. Самі по собі лабораторні результати є лише одним з аспектів призначення догляду за пацієнтом і не повинні бути єдиною основою для терапії, особливо якщо результати суперечать іншим детермінантам.
3. Реагенти для процедури тест-системи були сформульовані таким чином, щоб максимально усунути інтерференцію; однак потенційна взаємодія між поодинокими видами сироватки та тестовими реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто

спричиняють ці взаємодії та, як відомо, є проблемою для всіх видів імуноаналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноаналізів» Clin. Chem. 1988;34:27-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, історією захворювання та іншими клінічними даними. Для дійсних результатів тесту адекватні контролю та інші параметри повинні бути в межах перелічених діапазонів і вимог до аналізу.

4. Для дійсних результатів тесту адекватні контролю та інші параметри повинні бути в межах перелічених діапазонів і вимог до аналізу.
5. Якщо тестові набори змінено, наприклад, шляхом змішування частин різних наборів, що може дати хибні результати тесту, або якщо результати неправильно інтерпретовані, Monobind не несе відповідальності.
6. Якщо для інтерпретації результатів тесту використовується програмне забезпечення для аналізу даних, необхідно, щоб прогнозовані значення для калібраторів були в межах 10% від призначених концентрацій.
7. Рівні Прокальцитоніну зростають зі збільшенням тяжкості інфекції.⁶ Значення нижче 0.5 нг/мл (ng/ml) є показником низького ризику тяжкого сепсису або септичного шоку, а значення, що перевищують 2.00 нг/мл (ng/ml), вказують на високу ймовірність тяжкого сепсису або септичного шоку.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Прокальцитонін виявляється протягом 3-6 годин після бактеріальної інфекції. Підвищення концентрації безпосередньо залежить від тяжкості інфекції. Для неурожених груп населення очікуються значення менше 0.25 нг/мл (ng/ml). Використання для моніторингу ефективності лікування було добре задокументовано.

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які, як очікується, буде знайдено даним методом для популяції «нормальних» людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, популяції, що тестується, і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, лише до тих пір, поки внутрішній діапазон не буде визначений аналітиками за допомогою методу з корінним населенням території, в якій розташована лабораторія.

14.0 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність в аналізі та між аналізами Тест-системи Прокальцитонін AccuLite® ІХЛА визначали за допомогою аналізів трьох різних рівнів пулу контрольних сироваток. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі

Сироватка	N	x	σ	C.V., %
1	10	0.16	0.012	7.6
2	10	1.19	0.065	5.5
3	10	11.3	0.700	6.2

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами

Сироватка	N	x	σ	C.V., %
1	10	0.17	0.015	8.9
2	10	1.32	0.090	6.8
3	10	12.1	0.653	5.4

14.2 Специфічність

Тест на Прокальцитонін використовує антитіла проти N-кінцевої та кальцитонінової області Прокальцитоніну.

15.0 ЛІТЕРАТУРА

1. Meisner, M. "Update on procalcitonin measurements". Ann Lab Med. 2014 Jul;34(4): 263-73.
2. Meisner, M, Tschaikovsky K, Palmaers T, Schmidt J. "Comparisons of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS." Crit Care. 1999; 3(1): 45-50.
3. Kopterides P, Siempos II, Tsangaris I, Tsantes A, Armaganidis A. "Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials". Crit Care Med. 2010 Nov; 38(11): 2229-41.

4. Schuetz P, Albrich W, Christ-Crain M, Chastre J, Mueller B. "Procalcitonin for guidance of antibiotic therapy". Expert Rev Anti Infect Ther. 2010, 8(5): 575-57.
5. Bouadma L, et al. "Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units". Lancet. 2010, 375(9713): 463-74.
6. Harbarth, S, et al. "Diagnostic Value of Procalcitonin, Interleukin-6, and Interleukin-8 in Critically Ill Patients Admitted with Suspected Sepsis". Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 392-402.



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

