НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОКАЛЬЦИТОНІНУ

9225-300, Procalcitonin (PCT) Test System

Каталог. №: ***9225-300*** *Методика від* ***22-05-2018***
Кількість : ***96*** ***Версія 1***
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 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-PCT 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:

(дивись оригінал інструкції),

де $Ab_{(лунка)}$ = антитіла, нанесені в лунку (надлишкова кількість)
Ag_{PCT} = нативний антиген (змінна кількість)
^{Enz}Ab = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)
$^{Enz}Ab - Ag_{PCT} - Ab_{(лунка)}$ = 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 PCT – 1.0 мл/флакон (ліофілізовані)
6 флаконів референсної сироватки (стандартів) з концентраціями PCT 0 (**A**), 0.5 (**B**), 1.0 (**C**), 2.5 (**D**), 10 (**E**) і 25 (**F**) нг/мл. Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води. Розведені калібратори стабільні протягом 2 днів при 2-8 °C. Містять консерванти. Зберігати висушені калібратори при 2-8 °C. Для довшого зберігання після розведення аліквотуйте та заморозьте (< -20 °C) маленькі порції на термін до 3 місяців.

B. Контроль PCT - 1.0 мл/флакон (ліофілізований)
1 флакон контролю з концентрацією 3-5 нг/мл. Розвести вміст кожного флакона з 1.0 мл дистильованої або деіонізованої води. Розведені калібратори стабільні протягом 2 днів при 2-8 °C. Містять консерванти. Зберігати висушені калібратори при 2-8 °C. Для довшого зберігання після розведення аліквотуйте та заморозьте (< -20 °C) маленькі порції на термін до 3 місяців.

C. Ферментний реагент PCT – 6 мл/флакон
Один флакон, що містить кон'югат мишачих IgG з анти-PCT пероксидазою хрону в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при 2-8 °C.

D. Планшет з нанесеним PCT – 96 лунок
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий анти-PCT антитілами і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл/флакон
Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

F. Реагент субстрату – 12 мл/флакон
Один флакон, що містить ТМБ та перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C**.**

G. Стоп-розчин – 8 мл/флакон
Один флакон, що містить сильну кислоту (H_2SO_4). Зберігати при 2-8 °C.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °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 з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 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. Пластикова 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, 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, 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 (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. 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 до 30 днів. Не використовувати забруднені прилади. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл 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 контролі 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. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем

1. 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.
2. Додайте піпеткою по 50 мкл відповідного PCT калібратора, контролю або досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 50 мкл ферментного реагенту PCT у кожну лунку.
4. Перемішайте вміст лунок протягом 20-30 секунд до однорідності.
5. Накрийте і інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
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 кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну 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 ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл 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.
11. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

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

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 PCT в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації PCT в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації PCT 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 (див. мал.1)
5.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл)
Калібратор A	A1	0.009	0.009	0
	B1	0.009		
Калібратор B	C1	0.123	0.112	0.5
	D1	0.101		
Калібратор C	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		
Зразок	A3	2.188	2.168	15.3
	A4	2.148		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1

(Див. оригінал інструкції)

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F» 25 нг/мл) ≥ 1.3
2. 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

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 для даного пристрою може бути наданий Monobind.

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 отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.

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 невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Рівні PCT зростають при важкості захворювання. Значення нижче 0.5 нг/мл репрезентують низький ризик сепсису або септичного шоку. Значення вище 2.00 нг/мл вказують на високий ризик сепсису або септичного шоку.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

PCT виявляється протягом 3-6 годин після бактеріальної інфекції. Збільшення концентрації безпосередньо пов'язане з тяжкістю інфекції. Значення, менші ніж 0,25 нг/мл, 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 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору PCT 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 (нг/мл)

Взірець	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* (нг/мл)

Взірець	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. Межа виявлення (LoD) становить 0.05 нг/мл.

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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»