

НАБІР РЕАГЕНТІВ

КАЛЬЦИТОНІН УЛЬТРАЧУТЛИВИЙ ELISA

Calcitonin ultrasensitive ELISA

Каталог. №: EIA-1552

Кількість : 96

Дата випуску інструкції: 04-2019

Версія 9.0



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА Кальцитонін ультрачутливий – це імуноферментний аналіз для in vitro кількісного вимірювання людського Кальцитоніну (КТ) у сироватці.

2. КЛІНІЧНІ ПЕРЕДУМОВИ

Біологічна активність

Кальцитонін (КТ) - це пептидний гормон з 32 амінокислотами, що виділяється пара-фолікулярними С-клітинами щитовидної залози під контролем сироваткового кальцію. Після гострого введення цей пептид діє як потужний гіпокальціємічний і гіпофосфатемічний гормон, збільшуючи кальцієвий кліренс нирок і знижуючи резорбцію кістки. Проте його точна фізіологічна роль у метаболізмі кісток ще не повністю зрозуміла.

Різні форми КТ можуть бути виявлені в зразках крові, включаючи мономер КТ, окислений мономер, димер, форми з більш високою молекулярною масою і, можливо, попередник КТ. Концентрації цих пептидів змінюються в залежності від клінічного стану, функції нирок і тканинного походження КТ (нормальне або ектопічне продукування).

Медулярний рак щитоподібної залози (МТС) являє собою зляксісну пухлину, що розвивається з С-клітин, секретуючи кальцитонін у великому надлишку. Ця хвороба виникає або як спорадична (80%), або сімейна (20%) форма, яка передається як аутосомно-домінантний ген або як компонент множинної ендокринної неоплазії (IIb).

Помірна гіперкальцитоніємія також спостерігається під час вагітності, перніозної анемії, ниркової недостатності і в період неонатального періоду. Переважно, в даному аналізі виявляється мономерна форма КТ.

Клінічне застосування

Вимірювання КТ використовується для:

- Діагноз медулярного раку щитоподібної залози (МТС),
- Огляд зляксісних пухлин, перевірка успішності хірургічного втручання та спостереження за рецидивом,
- Діагностика доклінічних випадків спадкових форм МТС (МЕН 2 або Синдром Сіппла) шляхом використання стимуляції тестів (кальцій або пентагастрин),
- Вивчення патофізіології кальцій-фосфатного та кісткового метаболізму.

3. ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

Набір ультрачутливий кальцитонін ІФА - це твердофазний імунологічний аналіз чутливості підвищеної ензимом, який виконаний на мікротитровому планшеті. Калібратори і зразки реагують із захопленням моноклональним антитілом (MAb 1) покритим на мікротитровій лунці і з моноклональним антитілом (MAb 2) позначеним з пероксидазою хрому (HRP). Після інкубаційного періоду, що дозволяє утворити сендвіч: покритий MAb 1 - людський КТ - MAb 2 - HRP, мікротитровий планшет промивають для видалення нез'язаного ферменту, міченого антитілом. Пов'язане з міченим ферментом антитіло вимірюють за допомогою хромогенної реакції. Додають хромогенний розчин (ТМБ готовий до використання) і інкубують. Реакцію зупиняють додавши стоп-розчин і мікротитровий планшет потім зчитують на відповідній довжині хвилі. Кількість обороту субстрату визначається колориметрично шляхом вимірювання абсорбції, яка пропорційна концентрації кальцитоніну. Калібрувальна крива подується і концентрація Кальцитоніну у зразках визначається інтерполяцією з калібрувальної кривої.

4. РЕАГЕНТИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

	Реагенти	96 тестів набір	Реконструкція
MICROTITERPLATE	Мікропланшет з 96 анти-КТ(моноклональні антитіла)покриті крижкими лунками	96 лунок	Готовий до використання
Ab HRP CONC	Кон'югат: HRP-	1 флакон	Розведіть 50 x з

	позначений анти-КТ (моноклональні антитіла) у стабілізуючому буфері	0.125 мл	кон'югатом буферу
CONJ BUF	Кон'югат буферу: TRIS-малеатний буфер з бичачим сироватковим альбуміном, EDTA і тимолом	1 флакон 6 мл	Готовий до використання
CAL N	Калібратор N = 0 до 5 (див. точні значення на етикетках) у людській сироватці без КТ	6 флаконів ліоф.	Додайте 0.5 мл дистильованої води
SERUM	Людська сироватка без КТ (використовується для розведення зразків) з тимолом	1 флакон ліоф.	Додайте буфер (див. об'єм реконституції на етикетці)
BUF	Буфер(без сироватки): боратний буфер	1 флакон 8 мл	Готовий до використання
WASH SOLN CONC	Промивний розчин (Трис-HCl)	1 флакон 10 мл	Розведіть 200 x дистильованою водою (використовуйте магнітну мішалку)
CONTROL N	Контроль – N= або 2 у людській сироватці з гентаміцином	2 флакони ліоф.	Додайте 0.5 мл дистильованої води
CHROM TMB	Хромогенний розчин ТМБ (Тетраметилбензидин)	1 флакон 12 мл	Готовий до використання
STOP SOLN	Стоп розчин: HCl, 1N	1 флакон 12 мл	Готовий до використання

Примітка :

1. Людська сироватка без КТ використовується для розведення зразків.
2. 1 пг нашого референсного приготування еквівалентний 0.19 мкМО NIBSC 89/620.

5. МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ

Наступний матеріал необхідний, але не постачається в наборі:

1. Дистильована вода високої якості.
2. Прицезійні піпетки: 50 мкл, 100 мкл, 500 мкл і 1 мл (рекомендується використання точних піпеток з одноразовими пластиковими наконечниками)
3. Вортексний змішувач
4. Магнітна мішалка
5. Промивач для мікротитрового планшета
6. Мікропланшетний зчитувач з можливістю зчитування при 450 нм, 490 нм та 650 нм (біхроматичне зчитування).

6. ПІДГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Калібратори:

Реконститууйте стандарти з 0.5 мл дистильованої води.

2. Контролі:

Реконститууйте контролі з 0.5 мл дистильованої води.

3. Робочий промивний розчин:

Підготуйте правильний об'єм Робочого Промивного розчину, додаючи 199 об'єму дистильованої води до 1 об'єму промивного розчину (200x). Для гомогенізації використовуйте магнітну мішалку. В кінці дня утилізуйте невикористаний Робочий Промивний розчин.

4. Сироватка без КТ:

Реконститууйте Сироватку без КТ з кількістю буфера, яку вказано на етикетці. Не рушайте до повного розчинення, а потім добре перемішайте шляхом інверсії.

5. Робочий анти-КТ-HRP кон'югат:

Підготуйте відповідний об'єм розчину кон'югату, додавши наприклад: 40 мкл 50 x концентрованого анти-КТ-HRP кон'югату до 2 мл кон'югованого буферу. Для гомогенізації використовуйте вортекс. Рекомендується екстемпоральне приготування.

7. ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

- Перед відкриттям або реконституванням, всі компоненти набору стабільні до терміну придатності, вказаного на етикетці за умови зберігання при температурі 2°C - 8°C.
- Невикористані лунки потрібно зберігати при 2°C- 8°C у герметичній упакуванні з осушувачем до вказаного терміну придатності.
- Після реконституції, калібратори, контролі та сироватка без КТ є дуже нестабільними, тому потрібно їх негайно заморозити після використання та зберігати при -20°C протягом 3 місяців. Допускається тільки одне розмороження-замороження, тому після другого- утилізуйте всі стандарти, контролі та сироватку без КТ.
- Концентрований Промивний розчин стабільний при температурі 18°C- 25°C до терміну придатності.

- Свіжо приготовлений робочий промивний розчин, потрібно використати в той самий день.
- Після першого використання, концентрований кон'югат (50x) стабільний до терміну придатності, якщо його зберігати в оригінальному добре закритому флаконі при температурі 2°C - 8°C.
- Робочий анти-КТ-HRP кон'югат стабільний протягом 1 тижня при температурі 4°C.
- Хромогенний ТМБ розчин та Стоп розчин є стабільними при температурі 2°C-8°C до закінчення терміну придатності.
- Зміна фізичного вигляду реагентів набору може вказувати на нестабільність або погіршення.

8. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

- Сироватку слід зберігати при 2°C - 8°C.
- Якщо тест не виконується протягом 24 годин, рекомендується зберігати його в аліквотах при температурі -20°C. Уникайте подальшого розмороження-замороження.
- Перед використанням, всі зразки повинні бути 18°C-25°C. Перед використанням рекомендується вортексувати зразки.
- Не використовуйте гемолізовані зразки.
- Не використовуйте ліпемічні зразки.

9. ПРОЦЕДУРА

9.1 Примітки щодо обробки

- Не використовуйте набір або компоненти після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте матеріали з різних лотів набору.
- Ретельно перемішайте всі реагенти та зразки шляхом легкого збовтування або прокручування.
- Проводьте тестування калібраторів, контролів та зразків у дублікатах. Рекомендується вертикальне вирівнювання.
- Використовуйте чистий пластиковий контейнер, щоб підготувати Промивний розчин.
- Щоб уникнути перехресного забруднення, використовуйте чистий одноразовий наконечник для піпетки, щоб додати кожний реагент та зразок.
- Для дозування хромогенного розчину та стоп-розчину уникайте піпеток з металевими деталями.
- Висока точність піпеток або автоматизоване піпетувальне обладнання підвищить точність.
- Дотримуйтеся часу інкубації.
- Підготуйте калібрвальну криву для кожного запуску, не використовуйте дані з попередніх запусків.
- Хромогенний розчин повинен бути безбарвним. Якщо темно-синій колір розвивається протягом декількох хвилин після приготування, це вказує на те, що приготування не придатне до використання та повинне бути утилізоване.
- Розкладіть хромогенний розчин протягом 15 хвилин після промивання мікротитрового планшета.
- Під час інкубації з Хромогенним розчином, уникайте прямого попадання сонячного світла на планшет.

9.2 Процедура

1. Виберіть необхідну кількість смужок для виконання. Невикористані смужки слід запечатати в мішку з осушувачем та зберігати при температурі 2°C - 8°C.
2. Закріпіть стрипи у рамці для штативу.
3. Піпетуйте 100 мкл калібратора, контролю та зразка у відповідні лунки.
4. Піпетуйте 50 мкл робочого кон'югату у всі лунки.
5. Інкубуйте протягом 18±1 годин при температурі 2°C - 8°C.
6. Аспіруйте рідину з кожної лунки.
7. Промийте планшет 3 рази, шляхом: Внесення 0.4 мл промивного розчину у кожен лунку. Аспіруйте вміст кожної лунки.
8. Піпетуйте 100 мкл Хромогенного розчину у кожен лунку протягом 15 хвилин після етапу промивання.
9. Інкубуйте мікропланшет протягом 30 хвилин при температурі 18°C - 25°C уникаючи прямого сонячного світла.
10. Піпетуйте 100 мкл Стоп розчину у кожен лунку.
11. Зчитайте абсорбцію при 450 нм (референтний фільтр 630 нм або 650 нм) протягом 1 години та обчисліть результати як описано у наступному розділі.

10. ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Зчитайте планшет при 450 нм до референтного фільтру, встановленого при 650 нм (або 630 нм).
2. Обчисліть середнє значення повторюваних визначень.

3. Побудуйте значення ОЩ (ординату) для кожного стандарту до відповідної концентрації кальцитоніну (абсциса) і намалюйте калібрвальну криву через стандартні точки, з'єднавши точки прямими лініями.
4. Зчитайте концентрацію кожного контролю та зразка шляхом інтерполяції калібрвальної кривої.
5. Комп'ютерне скорочення даних спростить ці розрахунки. Якщо використовується автоматична обробка результатів, рекомендується встановити 4-параметрову логістичну криву.

11. ТИПОВІ ДАНІ

Наступні дані тільки для ілюстрації, тому ніколи не повинні використовуватися замість калібрвання кривої в режимі реального часу.

Кальцитонін ультрачутливий ELISA	Біхроматична модель (ОГ)	
Калібратор	0 пг/мл	0.009
	10 пг/мл	0.029
	50 пг/мл	0.127
	100 пг/мл	0.447
	200 пг/мл	0.919
	400 пг/мл	1.87

12 ЕФЕКТИВНІСТЬ ТА ОБМЕЖЕННЯ

12.1 Межа виявлення

Двадцять нульових калібраторів були проаналізовані разом з набором інших калібраторів. Межа виявлення, визначена як очевидна концентрація двох стандартних відхилень вище середнього значення ОГ при нульовому зв'язуванні, становила 0.7 пг/мл.

12.2 Специфічність

У цьому аналізі були випробувані деякі потенційно інтерферуючі гормони. При концентраціях до 100 нг/мл жоден з наступних гормонів не показав значних інтерференцій:

- CGRP
- Кальцитонін лососевих риб
- PDN 21
- Прокальцитонін N-термінальний

12.3 Точність

В АНАЛІЗІ				МІЖ АНАЛІЗАМИ			
Сироватка	N	<X>±CB (пг/мл)	KB (%)	Сироватка	N	<X>±CB (пг/мл)	KB (%)
A	19	43.0	1.7	A	8	44.6 ± 2.1	
B	19	±0.75	3.9	B	8	136.3 ± 8.1	

CB(SD) Стандартне відхилення; KB (CV) коефіцієнт варіації.

12.4 Правильність

ВИПРОБУВАННЯ ПРОЦЕСУ ВІДНОВЛЕННЯ

Доданий КТ (пг/мл)	Відновлений КТ пг/мл	Відновлення (%)
327.7	340.6	104
160.7	159.3	99
80.5	80.4	99
48.3	50.8	105

ВИПРОБУВАННЯ НА РОЗРІДЖЕННЯ

Зразок	Розрідження	Теоретична конц. (пг/мл)	Виміряна конц. (пг/мл)
Сироватка 1	1/1	-	300.6
	1/2	150.3	157.9
	1/4	75.1	75.5
	1/8	37.6	45.7
	1/16	18.8	25.2
	1/32	9.4	12.1
	1/64	4.7	5

Зразки були розріджені сироваткою без КТ.

12.5 Хук-ефект

Зразок пронизані КТ до 480000 пг/мл дає більш високі ОГ, ніж остання стандартна точка.

13. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Якщо результати, отримані для Control 1 та / або Control 2, не знаходяться в діапазоні, зазначеному на етикетці флакону, результати не можна використовувати, поки не буде надано задовільного пояснення розбіжності.

Якщо бажано, кожна лабораторія може скласти власні пули контрольних зразків, які повинні зберігатися замороженими в аліквотах. Контролі, що

містять азид, будуть перешкоджати ферментативній реакції і не можуть бути використані.

Критерії прийняття різниці між результатами дублікатів зразків повинні покладатися на добру лабораторну практику.

Рекомендується, щоб контролі регулярно аналізувалися як невідомі зразки для вимірювання варіабельності аналізу. Продуктивність аналізу слід контролювати за допомогою контрольних графіків контролів.

Хорошою практикою є візуальна перевірка відповідну криву, обраної комп'ютером.

14 РЕФЕРЕНСНІ ІНТЕРВАЛИ

Ці значення надані тільки для керування; кожна лабораторія повинна свій власний нормальний діапазон значень.

Нормальні значення 84 зразки з нормальних суб'єктів отримали значення нижче 11 пг/мл.

15 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Безпека

Використовувати тільки в діагностиці *in vitro*.

Компоненти крові людини, включені до цього набору, були протестовані затвердженими в Європі та / або схваленими FDA методами і виявилися негативними до HBsAg, анти-HCV, анти-VІЛ-1 та 2. Жоден відомий метод не може забезпечити повну гарантію того, що похідні крові людини не будуть передавати гепатит, СНІД або інші інфекції. Отже, обробка реагентів, зразків сироватки повинні відповідати місцевим процедурам безпеки.

Всі продукти тваринництва і похідні були зібрані у здорових тварин. Компоненти великої рогатої худоби походять з країн, де не було повідомлено про СЕГ. Проте, компоненти, що містять тваринні речовини, слід розглядати як потенційно інфекційні.

Уникайте будь-якого контакту шкіри з усіма реагентами, Стоп розчин містить HCl, хромогенний розчин містить ТМБ і H₂O₂. У разі контакту ретельно промити водою.

Не куріть, не пийте, не їжте і не використовуйте косметику в робочій зоні. Не піпетуйте ротом. Використовуйте захисний одяг та одноразові рукавички.



ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

