

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАЛЬЦИТОНІНУ МЕТОДОМ ІФА

## Calcitonin Test System

Кат. №: 9325-300A

Дата випуску інструкції: 06-02-2023

Версія: 3



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 кальцитоніну в сироватці людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

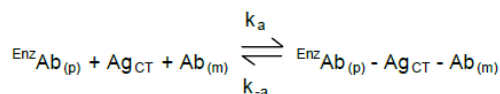
**2.0 ВСТУП** (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП

**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, 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 (ТМБ). Потім для зупинки реакції додають кислотний стоп-розчин, який перетворює колір на жовтий. Інтенсивність жовтого кольору прямо пропорційна концентрації кальцитоніну у зразку. Для побудови кривої доза-відповідь одиниць поглинання проти концентрації використовуються стандарти. Концентрації кальцитоніну, присутні у контролях та зразках пацієнтів, визначаються безпосередньо з цієї кривої.

Основними реагентами, необхідними для аналізу методом рівноваги типу сендвіч, є антитіла з високою спорідненістю та специфічністю (передача сигналу та захоплення) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі калібратор, контроль або зразок пацієнта додають до лунок, покритих антитілом анти-кальцитоніну. Кальцитонін із зразка зв'язується з анти-кальцитоніном (MoAb) у лунках. Згодом у лунки додають фермент, мічений анти-кальцитоніном. Кальцитонін із зразка утворює сендвіч між двома антитілами. Надлишок ферменту та зразка видалається за допомогою кроку промивання. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{(m)}$  = Анти-кальцитонін (MoAb) (надлишкова кількість у мікролунках)

$\text{Ag}_{CT}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(CT)}$  = Мічений ферментом мишачий  $\alpha$  СТ (P) (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(CT)} - \text{Ag}_{CT} - \text{Ab}_{(m)}$  = Сендвіч-комплекс Ag-антитіл

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, прямо пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних зразків сироватки з відомими значеннями антигена, можна створити криву доза-відповідь, за якою можна визначити концентрацію невідомого антигена.

У лунки додають відповідний субстрат для генерування 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 читати за допомогою мікропланшетного спектрофотометра для отримання кількісних результатів.

## 4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються з набором:

- A. Калібратори Кальцитоніну - 1.0 мл (мл)/флакон (сухі) - Значки A-F**  
Шість (6) флаконів референсного матеріалу для кальцитоніну з рівнями 0 (A), 10 (B), 40 (C), 150 (D), 400 (E) і 1000 (F) пг/мл (pg/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). **Розвести вміст кожного флакону з 1 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Розведені калібратори стабільні протягом 4 годин при 2-8 °C (°C). Додано консервант. Для більш тривалого періоду після відновлення розділіть на менші порції та заморозте (<-20 °C (°C)) до 3 місяців. Цикли заморожування та розморожування слід мінімізувати до одного разу.  
**Примітка:** Калібратори відстежуються відповідно до 1-го міжнародного стандарту WHO NIBSC Код 89/620. Значення в пг/мл (pg/ml) можна перетворити на мкМО/мл (μIU/ml), помноживши на 0.19. Наприклад, 40 пг/мл (pg/ml) x 0.19 = 7.6 мкМО/мл (μIU/ml) кальцитоніну.
- B. Контроль M Кальцитоніну - 1.0 мл (мл)/флакон (сухий) - Значок M**  
Один (1) флакон референсного контролю для Кальцитоніну. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). **Розвести вміст кожного флакону з 1 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.** Відновлений контроль стабільний протягом 4 годин при температурі 2-8 °C (°C). Додано консервант. Щоб зберігати протягом більш тривалого періоду, аликвотуйте на менші порції і заморозте (<-20 °C (°C)) до 3 місяців. Цикли заморожування та розморожування слід мінімізувати до одного разу.
- C. Ферментний реагент Кальцитоніну - 6 мл (мл)/флакон - значок E**  
Один (1) флакон, що містить моноклональне антитіло до кальцитоніну, з'єднане з HRP (пероксидазою хрому) у буфері на основі білка, та консервант, що не містить ртуті. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- D. Пластина, покрита антитілом Прокальцитоніну - 96 лунок - значок F**  
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий моноклональним антитілом до Прокальцитоніну/Кальцитоніну та упакований в алюмінієвий пакет з осушувачем. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- E. Концентрат Промивного розчину - 20 мл (мл)/флакон - значок G**  
Один (1) флакон, що містить сурфактант у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- F. Реагент Субстрату - 12 мл (мл)/флакон - значок S<sup>N</sup>**  
Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон - значок H**  
Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5M (M) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- H. Інструкція.**

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

**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 (°C), якщо не зазначено інше. Стабільність набору та компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного 96-лункового планшета. Щодо інших конфігурацій набору зверніться до таблиці в кінці вкладки.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)), 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетні вошери або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний зчитувач з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка мікропланшета для кроків інкубації.
7. Вакуумний аспіратор для кроків промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Матеріали контролю якості.

## 5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

### Набір призначений тільки для діагностики *in vitro* Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Реагенти, ліцензовані УПМ, були визнані такими, що не є реактивними до поверхневого антигена гепатиту В, ВІЛ 1 і 2 та антитіл до ВГС зі всіма продуктами, які містять людську сироватку. 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., публікація NHS № (CDC) 88-8395.

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

## 6.0 ЗБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів при зборі зразків методом венепункції. Для точного порівняння з встановленими нормальними значеннями слід взяти ранковий зразок сироватки натщесерце. Кров слід збирати у просту пробірку для венепункції з червоним ковпачком без добавок або антикоагулянтів. Дайте крові згорнутися для зразків. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку від клітин.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) максимум до 24 годин. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Унікайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) 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 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 проведення аналізу або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний Буфер

Розбавте концентрат Промивного розчину до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері. Зберігайте розведений буфер при температурі 2-30 °C (°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 (°C)).

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

- Відформатуйте лунки мікропланшета для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу в дублях. Поверніть невикористані стрипи назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).
- Дозуйте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) Ферментного реагенту в кожен лунку. Дуже важливо вносити всі реагенти поблизу дна лунки з покриттям.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати (500-600 об/хв (rpm)) і накрийте.
- Інкубуйте 60 хвилин (1 годину) при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 0.350 мл (ml) (350 мкл (µl)) промивного буфера (див. розділ «Підготовка реагентів»), потім декантуйте або аспіруйте його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний шошер

відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповніть кожен лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.

- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Реагенту субстрату в усі лунки. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (µl)) 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.
- Зчитайте абсорбцію кожної лунки на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 630 нм (nm) щоб мінімізувати недоліки лунки). Зчитування проводити протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Примітка 1:** Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 1000 пг/мл (pg/ml) 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 відкаліброваного дозатора та вносячи ближче до нижньої частини мікролунок під кутом, торкаючись бічної частини лунки.

## 10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Кальцитоніну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть абсорбції, отримані з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення абсорбції для кожного дублю калібратора проти відповідної концентрації Кальцитоніну в пг/мл (pg/ml) на лінійному міліметровому папері.
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- 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 (pg/ml)) з горизонтальної осі графіку (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено).

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

Приклад 1

ID Зразка	Концентрація (пг/мл (pg/ml))	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 Рисунку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

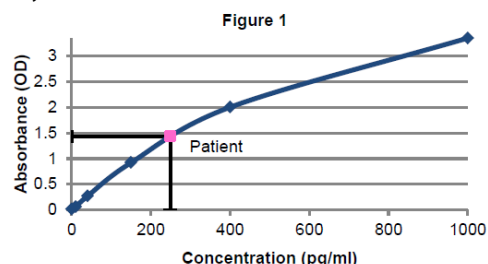


Figure 1 - Рисунок 1  
Absorbance (OD) - Абсорбція (ОЩ)  
Concentration (pg/ml) - Концентрація (пг/мл)

\*Якщо показання абсорбції виходять за встановлені межі або перевищують середню абсорбцію найвищого калібратора, зразок слід аналізувати повторно з розведенням.

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

**Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:**

1. Абсорбція (ОЩ) калібратора F (1000 пг/мл (pg/ml)) повинна бути  $\geq 1.3$ .
2. Чотири з шести пулів контролю якості повинні знаходитись у встановлених межах.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма Сертифікату безпечності матеріалу 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. Дозування зразків не повинно тривати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу.
3. Не використовувати високоліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один (1) 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. Зчитування абсорбції на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час кроків промивання аспірацією або декантацією) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лоту. 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 вказівок можуть давати невірні результати.
10. Необхідно суворо дотримуватися всіх застосованих національних стандартів, правил і законів, включаючи, але не обмежуючись, належної лабораторної процедури, щоб забезпечити відповідність і належне використання пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, Дозаторів, Зчитувачів, Вошерів та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним набором. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/EC IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою за [Monobind@monobind.com](mailto: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 призначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур тест-системи були розроблені для усунення максимальних інтерференцій; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та реагентами набору 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 контролю 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 калібраторів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

7. Набір для аналізу кальцитоніну ІФА не продемонстрував ефекту високої дози із зразками, в які було додано 1 000 000 пг/мл (pg/ml) кальцитоніну. Однак зразки з рівнями кальцитоніну, вищими за найвищий калібратор, слід розбавити та повторно проаналізувати для отримання коректних значень.

## 13.0 ДІАПАЗОНИ ОЧІКУВАНИХ ЗНАЧЕНЬ

Рівні кальцитоніну вимірювали у, ймовірно, нормальних осіб (N=246). Отримані значення коливались від 0.455 до 12.932 пг/мл (pg/ml). На основі статистичних тестів на зсув та ексцес, популяція, перетворюючись логарифмічно, дотримується нормального або Гаусового розподілу, як показано на гістограмах. Середнє геометричне  $\pm 2$  стандартних відхилення від середнього (> 95% достовірності) було розраховано та виявилось  $6.2 \pm 5.6$  пг/мл (pg/ml).

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 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 14.1 Точність

Точність в аналізі та між аналізами Тест-системи Кальцитонін AccuBind® ІФА визначали шляхом аналізу трьох пулів різних рівнів пулів контрольної сироватки. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення ( $\sigma$ ) та коефіцієнт варіації (C.V.) кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 1 та Таблиці 2.

**ТАБЛИЦЯ 1**

Зразок	Точність в аналізі (значення в пг/мл (pg/ml))			
	N	X	$\sigma$	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**

Зразок	Точність між аналізами (значення в пг/мл (pg/ml))			
	N	X	$\sigma$	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

Тест-система Кальцитонін AccuBind® ІФА має LoB = 1.84 пг/мл (pg/ml) та LoD = LoQ = 2.15 пг/мл (pg/ml).

Таблиця: Перехресна реактивність

РЕЧОВИНА	Протестована к-сть	Перехресна реактивність
Прокальцитонін	100 нг/мл (ng/ml)	<0.001
Катакальцин	25 нг/мл (ng/ml)	<0.001
a-CGRP	30 нг/мл (ng/ml)	<0.001
b-CGRP	30 нг/мл (ng/ml)	<0.001
Паратиреоїдний гормон	10 нг/мл (ng/ml)	<0.001



## ВИРОБНИК

MONOBIND INC.  
100 North Pointe Dr.  
Lake Forest, CA 92630 - USA  
Phone: 949.951.2665  
Fax: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)

МОНОБАЙНД ІНК  
100 Норд Поінт Драйв  
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США  
Тел.: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

