

НАБОР чКальцитонин [I-125] IRMA

(Номер по каталогу: RK-83CT)

Система ¹²⁵I-чКальцитонин IRMA позволяет проводить прямое количественное определение человеческого кальцитонина *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение кальцитонина может проводиться в диапазоне 0-2000 пг/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 100 мкл. Каждый набор содержит материалы для 100 пробирок для количественного определения, что позволяет построить одну стандартную кривую и выполнить количественное определение 42 неизвестных образцов и 2 контролей в двух экземплярах.

Введение

Кальцитонин (молекулярная масса 3,4 кДа) секретируется парафолликулярными С-клетками щитовидной железы. Гормон состоит из 32 аминокислотных остатков. Кальцитонин оказывает свое биологическое действие за счет воздействия на органы-мишени: кости, почки и желудочно-кишечный тракт. Физиологическая роль кальцитонина в костном метаболизме не до конца известна и является предметом изучения. Установлено, что значительное повышение уровня кальцитонина характерно для С-клеточной гиперплазии щитовидной железы и медулярного рака щитовидной железы (МРЦЖ). МРЦЖ составляет 5-10% от всех случаев рака щитовидной железы. Существует две формы МРЦЖ: наследственная и спорадическая. Определение уровня кальцитонина в сыворотке человека рекомендуется для диагностики и мониторинга МРЦЖ, а также для диагностики доклинических случаев наследственной формы МРЦЖ. Возможна ложная кальцитонино-подобная иммунореактивность, обусловленная различными кальцитонин-связанными веществами, включая мономерные, димерные и полимерные формы, а также фрагменты и предшественники самого гормона.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиомерического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоафинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченое ¹²⁵I, связывается с эпитопом молекулы кальцитонина, которая отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который присутствует в стандарте или в образце, что приводит к образованию комплекса иммобилизованное антитело

– антиген – сигнальное антитело, также известного как «сэндвич».

В течение периода инкубации продолжительностью более 12 часов иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционную смесь извлекают, пробирки тщательно промывают и производят замер их радиоактивности в гамма-счетчике. Концентрация антигена прямо пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество Кальцитонина, может быть определена искомая концентрация Кальцитонина в образцах пациента.

Содержание набора

1. 1 флакон МЕТКИ, готовой к использованию, 11 мл/флакон, содержащей <740 кБк ¹²⁵I-сигнал и иммобилизованные антитела в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.

2. 6 флаконов СТАНДАРТОВ, (S0-S5, 6 x 1 мл) лиофилизированных в сыворотке лошадей с 0.1% NaN₃. Точная концентрация указана на каждом флаконе и в сертификате качества (откалиброваны в соответствии с Международным стандартом ВОЗ 89/620.). См. *Приготовление реактивов*.

3. 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (СI-СII, 2 x 1 мл). Лиофилизированная сыворотка крови человека с 0,1% NaN₃. См. *Приготовление реактивов*. Приемлемый диапазон контрольной сыворотки указан в прилагаемом сертификате качества.

4. 1 флакон РАСТВОРА ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ СЫВОРОТКИ, готовый к использованию 2.0 мл на флакон, содержит сыворотку лошадей с 0.1% NaN₃.

5. 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовые к использованию. 2x50 пробирки, 12 x 75 мм, упакованные в пластиковые коробки.

6. 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащего 0,2% NaN₃. См. *Приготовление реактивов*. Сертификат качества. Листок-вкладыш.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

- общее лабораторное оборудование
- высокоточные микропипетки 100 мкл
- автоматические пипетки 100 мкл
- автоматические пипетки 2000 мкл или диспенсер
- полимерная пленка для закрытия пробирок
- абсорбирующая ткань
- гамма-счетчик.

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8°C, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (-20°C). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать.

Приготовление реактивов, хранение

Для получения 720 мл промывочного раствора добавьте 20 мл концентрата промывочного буфера к 700 мл дистиллированной воды. Приготовленный раствор хранить при температуре 2-8°C до окончания срока годности.

Добавьте к лиофилизированным стандартам и контрольной сыворотке 1 мл дистиллированной воды Аккуратно перемешайте встряхиванием или взбалтыванием (следует избегать образования пены). Убедитесь, что достигнуто полное растворение и дайте раствору уравновеситься при комнатной температуре в течение 20 минут. **При дальнейшем использовании хранить восстановленные стандарты и контроли при температуре -20°C до окончания срока годности.**

Открытые образцы следует хранить при температуре 2-8°C. При данной температуре все реактивы стабильны до истечения срока годности.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры. Гомогенизируйте все реактивы и образцы, аккуратно перемешав их, избегая вспенивания.
2. Промаркируйте два экземпляра пробирок с покрытием для каждого из стандартов (S0-S5), контрольной сыворотки (СI, СII) и образцов.
3. Внесите пипеткой по 100 мкл стандартов, контроля и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки. Для фиксации пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь или не царапайте внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
4. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 100 мкл метки.
5. Аккуратно перемешайте все пробирки. Закройте все пробирки полимерной пленкой.
6. Инкубируйте пробирки в течение 16-24 часов при комнатной температуре.
7. Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разбавленного промывочного буфера. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в

- перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.
- Верните штатив с пробирками в прежнее положение и повторите шаг 7 еще два раза.
 - Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
 - Рассчитайте концентрацию Кальцитонина в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов» или используйте для этого специальное программное обеспечение.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	всего	Стандарт	Образец	Контроль
Стандарт		100		
Образец			100	
Контроль				100
Метка	100	100	100	100
Перемешивать в течение 16-24 часов при комнатной температуре.				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и поставить перевернутую пробирку на фильтровальную бумагу				
Измерить уровень радиоактивности (60 сек/пробирка).				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2. Рассчитайте среднее значение в минуту (СРМ) для каждой пары исследуемых пробирок. Рассчитать нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$V/T(\%) = \frac{S_{1-5} / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график В/В₀ (%) для каждого стандарта в соответствии с соответствующей концентрацией кальцитонина.

Определите концентрацию кальцитонина в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных прикладных программ автоматической обработки данных, в данном случае можно использовать логит-преобразование или аппроксимацию данных с помощью сплайн-функций.

Так же доступна автоматизированная система обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Среднее значение cpm	В/Т %
T	303 022	-
S0	182	0.06
S1	1 459	0.42
S2	4 759	1.51
S3	15 195	4.95
S4	46 921	15.4
S5	143 589	47.3
CI	2 804	0.87
СИ	9 714	3.15

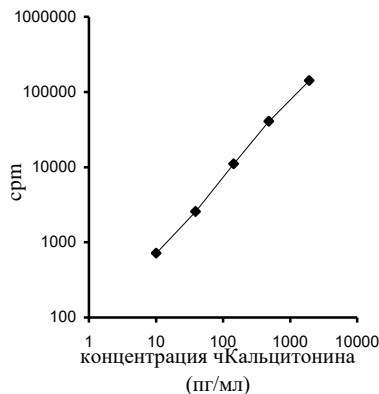


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для подсчета значений образцов)

Характеристика количественного определения

Чувствительность

Аналитическая чувствительность 0,5 пг/мл была определена с использованием 20 копий ответа нулевого стандарта. Чувствительность определяется как концентрация, соответствующая сумме среднего значения cpm и его двойного стандартного отклонения.

Предел холостого раствора (ПХ), Предел обнаружения (ПО) и Предел количественного определения (ПКО) были определены в соответствии с руководством CLSI документ EP17.

Предел холостого раствора (ПХ): 0.65 пг/мл

Предел обнаружения (ПО): 1.2 пг/мл

Предел количественного определения (ПКО): 2.0 пг/мл

Функциональная чувствительность равна Пределу количественного определения.

Точность и воспроизводимость

Для определения внутрисубъектной вариабельности было проанализировано 7 образцов по 20 повторов. Для определения межсубъектной вариабельности было проанализировано 7 образцов в ходе 20 независимых анализов, проведенных 3 разными исполнителями с помощью наборов из разных партий. Ниже представлены полученные значения.

Образец	Внутрисубъектная вариабельность		Межсубъектная вариабельность	
	Среднее значение пг/мл	CV %	Среднее значение пг/мл	CV%
1	0.9	17.9	1.8	21.9
2	23.6	2.7	24.9	5.1
3	25.3	3.2	28.2	6.0
4	161.2	1.6	170.6	6.2
5	180.8	4.4	198.0	6.6
6	348.3	1.7	364.4	6.4
7	782.3	1.4	812.4	6.4

Восстановление

Под восстановлением понималось зафиксированное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиков в образцах сыворотки крови с известным количеством Кальцитонина. Для 4 образцов сыворотки крови с Кальцитонином на 3 уровнях было получено значение 101-122%.

Специфичность

Моноклональные антитела, используемые в этом наборе, специфичны для человеческого Кальцитонина. Воздействие человеческого Прокальцитонина не может быть обнаружено для концентрации Прокальцитонина ≤ 80 нг/мл.

Линейность

Пять отдельных образцов сыворотки серийно разбавляли человеческой сывороткой с низкой концентрацией Кальцитонина и измеряли в соответствии с протоколом набора. Среднее восстановление после разведения составило 110%. Следующее уравнение, полученное для измеренной (Y) и ожидаемой (X) концентрации, демонстрирует хорошую линейность:

$$Y = 1,1394X - 1,5616$$

$$R^2 = 0,9951 \quad n = 20$$

Эффект крючка

При концентрациях кальцитонина до 300000 пг/мл «высокодозный эффект крючка» отсутствует. Образцы, ожидаемые концентрации которых превышают наивысший стандарт, должны быть разбавлены сывороткой для разведения и проанализированы повторно. Рекомендуются последовательные разведения 1:10.

Ожидаемые значения

Основываясь на измерении 607 образцов сыворотки предположительно здоровых взрослых людей (304 женщины и 303 мужчины), ожидаемый диапазон уровня кальцитонина составляет 0-10 пг/мл (99,8% образцов).

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные интервалы эталонных значений для своей популяции пациентов.

Ограничения

Реагенты, поставляемые с данным набором, предназначены для определения уровней кальцитонина в сыворотке. Следует предостеречь возможность размораживания-повторного замораживания реактивов и образцов.

Не следует использовать гемолизированные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.

Полученные результаты следует интерпретировать только в контексте общей клинической картины.

В некоторых патологических ситуациях уровень кальцитонина может повышаться без какой-либо диагностической или прогностической значимости, например, в некоторых случаях при гиперкальциемии, почечной недостаточности, гипергастринемии и остром панкреатите.

Примечания к методике

Несоблюдение данной инструкции может значительно повлиять на результаты.

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

1) Причина ошибки! Пробирки для реакции, упакованные в пластиковые коробки, не промаркированы индивидуально. Необходимо соблюдать осторожность и не перепутать их с обычными пробирками. Для снижения этого риска никогда не доставайте из пластиковых коробок больше пробирок, чем нужно для анализа, и помещайте неиспользованные пробирки обратно в коробки. Рекомендуется сразу маркировать используемые пробирки специальным маркером.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуноферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (анти-HCV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Продукты животного происхождения, использованные в наборе, были получены у здоровых животных. Тем не менее с продуктами животного происхождения

следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.













Химическая опасность


В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 61 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 67 дней с момента готовности.


	Использовано		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики <i>in vitro</i>		Раствор для разведения сыворотки

 Производитель

 8°C

Температурный предел
Хранить при температуре 2-8°C

REF Номер по каталогу

 Радиоактивный материал

CE

Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

ООО «Институт изотопов»

1535 Будапешт. Pf.: 851.

Тел.: (36-1) 392-2577,

Факс: (36-1) 395-9247

Обновлено: март 2021