

人降钙素检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

货号：#7024

【产品名称】

通用名称：人降钙素检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：Calcitonin ELISA

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测人血清中降钙素(1-32)的水平。适用于体外诊断。

【概述】

降钙素来源于甲状腺滤泡旁细胞(C细胞),是一个由32个氨基酸组成的多肽,其主要生理功能在于抑制破骨细胞的骨吸收。降钙素的这个功能使其在对骨吸收增加的病人(如佩吉特病)及骨质疏松患者的评估中具有重要意义。

伴有降钙素无序大量分泌的最显著临床病症是甲状腺髓质癌(MTC)。MTC是一种甲状腺产降钙素C细胞肿瘤,较为少见,约占所有甲状腺癌的5-10%,往往具有高致命性。MTC可以散发,也可能是常染色体显性遗传的家族病。MTC由于其家族分布特性而具有重要的临床意义。通过检测血清降钙素水平,可以对MTC进行早期诊断,从而使得早期亚临床疾病的完全治愈成为可能¹。MTC通常伴有其它临床症状,手术治疗是行之有效的办法。虽然MTC是一类较为少见的肿瘤疾病,但往往以多发性内分泌瘤的家族病模式^{1,3,4}发病。这些肿瘤通常引起血清降钙素浓度显著增加,因此对降钙素进行免疫学检测可用于诊断MTC,然而少数病人(比例很小但逐渐升高)的荷尔蒙基线水平与正常水平区别不大¹。部分患者表现出早期C细胞瘤或增生,最适合进行手术治疗。为鉴别早期患者及排除假阴性结果,应在基本的降钙素检测基础上进行刺激性测试。多数肿瘤会因钙元素或五肽促胃酸激素或二者结合物的使用而导致降钙素水平增加,但任何药剂都可能产生错误的结果。因此,在临床表现中,都应先进行诊断测试。而且,对于适用降钙素治疗的肿瘤患者,降钙素的测量同样可用于检测疗效。

据报道⁸,在健康人和MTC患者体内均发现有多种类型的具有免疫反应活性的降钙素,这些降钙素的分子量从3400道尔顿(单体)到70000道尔顿(聚合物)不等。

其它神经内分泌细胞肿瘤疾病也会导致降钙素水平升高,比如小细胞肺癌。另外,其它肿瘤疾病比如良性肿瘤和胰岛细胞瘤也会引起血清降钙素水平升高。

在急慢性肾衰竭、高钙尿和高钙血患者中均发现血清降钙素水平升高。

【检验原理】

本试剂盒采用双抗体夹心法,应用了两种不同的抗-人降钙素小鼠单克隆抗体。其中一种抗体已被生物素标记,仅与降钙素的11-23区域结合;另一种抗体则特异性结合降钙素的21-32区域并已被辣根过氧化物酶(HRP)标记。

链霉亲和素包被的微孔内表面—生物素标记抗体(11-23)—降钙素—HRP偶联抗体(21-32)

在本检测中,标准品、质控品或病人样本与生物素标记抗体和酶结合抗体一起加入链霉亲和素包被的微孔内孵育,形成夹心复合体。孵育后通过洗涤除去孔内未结合的抗体及其他组分,加入底物液(TMB)孵育一定时间后加入酸性终止液终止反应,溶液颜色变为黄色,之后在酶标仪上测量吸光度。黄色的亮度直接与样本中降钙素的浓度成正比例关系。以每个标准品的降钙素浓度对其相应的吸光度值描点绘出标准曲线,质控品和样本中的降钙素浓度直接由此标准曲线推算而得。

【主要组成成份】

1. 链霉亲和素包被的微孔板(PLA)

12×8孔条(96孔),附板框。

2. 生物素标记的抗-降钙素抗体(RGT 1)

1瓶,5.4mL。

3. HRP偶联的抗-降钙素抗体(RGT 2)

1瓶,5.4mL。

4. 标准品(CAL A-F)

冻干粉未状。0pg/mL标准品为BSA溶液,其余标准品为含有合成人降钙素(1-32)的BSA溶液,已按照WHO 2nd IS 89/620校准。标准品的准确浓度标于瓶身标签。6瓶,0pg/mL标准品为2mL,其余为1mL。

5. 质控品1&2(CTRL)

冻干粉未状。两个水平。含有合成人降钙素(1-32)的BSA溶液。质控范围标于瓶身标签。2瓶,每瓶1mL。

6. 浓缩冲洗液(RGT A)

含有表面活性剂、盐。1瓶,30mL。

7. TMB底物(RGT B)

含有四甲基联苯胺(TMB)过氧化氢的溶液。1瓶,15mL。

8. 终止液(SOLN)

1N硫酸。1瓶,20mL。

9. 复溶液(RGT 3)

含有EDTA。1瓶,10mL。

【储存条件及有效期】

浓缩冲洗液室温保存以防止沉淀生成,其余试剂在2-8℃中保存。复溶后的标准品、质控品在-20℃中保存6周,冻融不超过3次。

【适用仪器】

适用于具有450nm和405nm波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

使用血清作样本。每个样本双份检测,需要200μL的血清量。使用非抗凝管采集全血,待血液凝块后立即分离血清,最好低温离心。如不立即使用,需保存于-20℃或更低温度。避免大量溶血或使用脂血样本。

【检验方法】

1. 自备材料

- 酶标仪 (450nm 和 405nm);
- 洗板机 (人工洗板亦可);
- 高精度移液器 (50, 100 和 150 μ L);
- 多通道移液器或移液管 (50, 100 和 150 μ L) (可选择)

2. 试剂准备

1) 标准品和质控品: 用 2.0mL 蒸馏水或去离子水复溶标准品 A (0pg/mL 标准品), 充分混匀。其余标准品 (B-F) 和质控品均用 1.0mL 试剂 3 (复溶液) 复溶, 充分混匀。静置 10 分钟后缓缓地反复颠倒瓶子, 确保复溶完全。复溶后立即使用, 未使用的立即冷冻保存于-20 $^{\circ}$ C, 可保存 6 周。最多冻融 3 次。

2) 工作洗液: 稀释前充分摇晃瓶子或 37 $^{\circ}$ C 水浴使沉淀物充分溶解。稀释时将整瓶浓缩洗液 (30mL) 加入到 570mL 蒸馏水或去离子水中并混匀。稀释后室温保存 90 天。

其它试剂直接使用。

3. 检测步骤

检测前将所有试剂平衡至室温, 按照试剂准备的描述立即复溶标准品和质控品。使用前轻轻混匀所有试剂。

- 1) 将所需数量的链霉亲和素包被的微孔板条置于板框中。
- 2) 于指定孔内各加入 100 μ L 标准品、质控品和样本。
- 3) 每孔内加入 50 μ L 试剂 1 (生物素标记抗体)。
- 4) 每孔内加入 50 μ L 试剂 2 (酶标抗体)。避光条件下置于旋转器上 (170 \pm 10rpm) 室温 (22 $^{\circ}$ C -28 $^{\circ}$ C) 孵育 4 小时 \pm 30 分钟。
- 5) 洗板 5 次, 每孔分配 0.35mL 工作洗液。
- 6) 每孔内加入 150 μ L 试剂 B (TMB 底物)。
- 7) 避光条件下置于旋转器上 (170 \pm 10rpm) 室温 (22 $^{\circ}$ C -28 $^{\circ}$ C) 孵育 30 \pm 5 分钟。
- 8) 每孔内加入 100 μ L 终止液, 轻轻混匀。
- 9) 加入终止液后 10 分钟内依次于酶标仪 450nm 和 405nm 波长处测量吸光度, 以 250 μ L 蒸馏水或去离子水作为空白对照。

注意: 第二次测量用于增加标准曲线的分析有效性。对于浓度不超过 300pg/mL 的样本, 使用 450nm 波长处的标准曲线, 而对于浓度超过 300pg/mL 的样本, 则使用 405nm 波长处的标准曲线。

10) 根据所得标准品的吸光度值及其浓度描点, 通过立方样条曲线、四参数对数曲线或点对点折线计算降钙素的浓度。

【参考值 (参考范围)】

以下数据仅供参考, 建议实验室建立自己的参考范围。应用本试剂盒测定 59 位健康女性和 52 位健康男性的降钙素水平, 获得女性正常值范围: 0.1-10.9pg/mL, 男性正常值范围: 0.2-27.7pg/mL。经统计学分析后得到校正后的范围:

健康女性: 0.07-12.97 pg/mL;

健康男性: 0.68-30.26 pg/mL。

据文献报道^{2,9}, 健康女性的降钙素水平要远低于健康男性。健康女性和健康男性的降钙素水平应

分别低于 13 pg/mL 和 30 pg/mL。

【检验结果的解释】

1. 结果计算

手工方法

1) 使用前 5 个标准品 (A-E) 构建 450nm 处的标准曲线, 使用后 3 个标准品 (D-F) 构建 405nm 处的标准曲线。

2) 在线性坐标轴上以标准品浓度为 X 轴, 其吸光度为 Y 轴描点。

3) 在相邻点间划直线, 形成常见的点对点折线图。根据样本的吸光度值在该折线图中读取其浓度值。浓度不超过 300pg/mL 的样本和质控品, 在 450nm 处的标准曲线上读取结果, 而对于浓度超过 300pg/mL 的样本和质控品, 则在 405nm 处的标准曲线上读取结果。

自动法

应用计算机数据处理软件的立方样条曲线或四参数对数曲线或点对点折线进行拟合。

数据举例 1 (450nm):

孔别 (pg/mL)	吸光度 (双孔)	吸光度 平均值	降钙素 (pg/mL)	降钙素 (pg/mL) 报告值
标准品 A	0.008 0.009	0.0085		0
标准品 B	0.059 0.064	0.0615		10
标准品 C	0.186 0.194	0.190		30
标准品 D	0.578 0.602	0.590		100
标准品 E	1.900 1.882	1.891		300
质控	0.127 0.122	0.125	20.6	20.6
质控	2.554 2.565	2.560	>300	*
样本 1	0.034 0.040	0.037	4.7	4.7
样本 2	0.104 0.098	0.101	16.3	16.3
样本 3	0.397 0.411	0.404	68.7	68.7
样本 4	2.195 2.173	2.184	>300	*

数据举例 2 (405nm):

孔别 (pg/mL)	吸光度 (双孔)	吸光度 平均值	降钙素 (pg/mL)	降钙素 (pg/mL) 报告值
标准品 A	0.005 0.005	0.005		0
标准品 D	0.187 0.198	0.193		100
标准品 E	0.602 0.597	0.599		300
标准品 F	1.898 1.910	1.904		1000
质控	0.045	0.045	<300	*

	0.044			
质控	0.814 0.816	0.815	403	403
样本 1	0.016 0.020	0.018	<300	*
样本 2	0.039 0.035	0.037	<300	*
样本 3	0.128 0.134	0.131	<300	*
样本 4	0.697 0.689	0.693	345	345

注意：上述数据仅供举例，不用于其它结果的计算。

【检验方法的局限性】

检测添加了 1000000pg/mL 纯降钙素(1-32)的样本时，并未发现高值钩端效应。对于降钙素水平高于最高浓度标准品(1000pg/mL)的样本，应稀释后重新检测。同所有辅助诊断指标一样，应结合病人的临床表现和其它检测数据对降钙素的结果进行分析评估。

【产品性能指标】

1. 准确度

分别应用本试剂盒和放免法对 77 例病人样本的降钙素水平(0.8-3113pg/mL)进行了测定，通过曲线拟合分析后获得以下数据：

本试剂盒结果=0.940 放免法结果+6.55pg/mL
R=0.993, N=123。

另外，分别应用本试剂盒和免疫化学发光法对 51 例病人样本的降钙素水平(<0.7-2240pg/mL)进行了测定，通过曲线拟合分析后获得以下数据：

本试剂盒结果=1.094 放免法结果-6.13pg/mL
R=0.995, N=123。

2. 灵敏度

本试剂盒的灵敏度即最低检测限，定义为 95% 置信度下可区别于 0 pg/mL 的检测值。本试剂盒的灵敏度为 1.0pg/mL。

3. 精密度与重复性

批内差：应用本试剂盒分别对三个样本进行 20 份检测。

样本	平均值 (pg/mL)	N	变异系数 %
A	24.3	20	5.7
B	94.9	20	4.3
C	403	20	2.8

批间差：应用本试剂盒分别对三个样本进行 15 次检测。由 3 个技术员操作，使用 2 个不同批号试剂盒，历时 3 周。

样本	平均值 (pg/mL)	N	变异系数 %
A	16.5	15	7.4
B	64.5	15	7.4
C	340	15	6.1

4. 回收率

通过向 4 个不同的病人样本中加入不同浓度的降钙素测定其回收率。所得结果见下表：

血清 样本	降钙 素	降钙 素	预期 值	检测 值	回收 率
----------	---------	---------	---------	---------	---------

	内生 pg/mL	添加 pg/mL	pg/mL	pg/mL	%
A	0	—	—	—	—
	0	100	100	100	110
	0	200	200	217	109
B	9.7	—	—	—	—
	8.7	100	109	106	97
	7.8	200	208	207	100
C	0	—	—	—	—
	0	100	100	104	104
	0	200	200	205	103
D	5.7	—	—	—	—
	5.1	126	131	119	91
	4.6	220	225	203	90

5. 特异性与交叉反应

检测下表中每个交叉反应物加入样本前后的降钙素水平，并未发现任何的交叉反应干扰，其细微变化处于批间差范围内。

交叉反应物	反应物 浓度 pg/mL	加反应物前降 钙素浓度 pg/mL	加反应物后降 钙素浓度 pg/mL	浓度变 化值 pg/mL	交叉反 应率%
PTH(1-84)	100000	186	194	8	0.00800
	30000	186	200	14	0.04667
	10000	186	194	8	0.08000
降钙素基 因相关肽	1000000	200	202	2	0.00020
	100000	200	204	4	0.00400
鲑鱼降钙 素	1000000	191	194	3	0.00030
	100000	191	199	8	0.00800
TSH	5000	198	203	5	0.00061
	500	198	198	0	0.00000
	50	198	199	1	0.01220

6. 动力学效应

7. 样本稀释线性

使用标准品 A (0pg/mL 标准品) 稀释 6 个病人血清样本后应用本试剂盒对其进行检测。结果见下表：

样本	稀释度	预期值	观测值	%观测值/ 预期值
A	未稀释	—	343	—
	1:2	172	168	98
	1:4	85.8	81.3	95
	1:8	42.9	40.3	94
B	未稀释	—	271	—
	1:2	136	131	97
	1:4	67.8	70	103
	1:8	33.9	34.3	101
C	未稀释	—	265	—
	1:2	133	134	101
	1:4	66	70.4	106
	1:8	33.1	32.5	98
D	未稀释	—	>1000	—
	1:2	—	1060	—
	1:4	530	504	95
	1:8	265	271	102

E	未稀释	—	231	—
	1 : 2	116	116	100
	1 : 4	57.8	58.8	102
	1 : 8	28.9	27.1	94
	1 : 16	14.4	12.1	84
F	未稀释	—	>1000	—
	1 : 2	—	997	—
	1 : 4	499	429	86
	1 : 8	249	223	89
	1 : 16	125	119	95

【注意事项】

1. 本试剂盒内的试剂不含任何人血成分，但病人样本可能出现 HBsAg, HBcAg 或 HIV 抗体阳性，因此必须按照潜在传染物的常规处理方法对未知病人样本进行处理。
2. 终止液由 1N 硫酸组成，虽然经过稀释，但仍具有强腐蚀性并可引起烧伤。因此操作时应小心谨慎，采取适当防护措施避免受伤。一旦溅出，立即用大量水冲洗。
3. 由于降钙素分子（1-32）不稳定，在复溶标准品、质控品和样本后应立即检测。
4. 建议标准品、质控品和样本均进行双孔检测，计算结果时使用平均吸光度值。
5. 加样时尽量避免气泡产生。
6. 若病人样本的降钙素浓度超出最高浓度标准品（标准品 F），应用标准品 A（0mg/mL 标准品）稀释后重新检测。计算结果时应乘上稀释因子。
7. 不同批号试剂勿混用。
8. 可以先将试剂 1（生物素标记抗体）和试剂 2（酶标抗体）混合后再加入微孔内。混合后的试剂 4 下可保存 7 天。
9. 混匀时防止试剂从微孔内溅出而影响检测的准确度和精密密度。

【参考文献】

1. Deftos, L.J., **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**, (edited by Favus, N.J.), 1st Edition, American Society for Bone and Mineral Research, pp 53 – 55, 1990.
2. Deftos, L.J., Weisman M.H., Williams G.H., Karpf, D.B., Frumar, A.M., Davidson, B.H., Parthemore, J.G., Judd, H.L., Influence of age and sex on plasma calcitonin in human beings. **N. Engl. J. Med.** 302:1351-1353, 1980.
3. Travis, J.C., (ed) **Clinical Radioimmunoassay . . . State-of-the-Art**, **Scientific News Letters, Inc.** Radioassay - Legend Assay Publishers, Anaheim, CA 92803, 1980, 1st Edition.
4. Austin, L.A., and Heath, H., III, Medical Progress,

Calcitonin Physiology and Pathophysiology, **N. Engl. J. Med.** 304:269,1981.

5. Parthemore, J.G., Bronzert, G.R., and Deftos, L.J., A short calcium infusion in the diagnosis of medullary thyroid carcinoma, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 39:108,1974.
6. Hennedssy, J.F., Wells, S.A., Ontjes, D.A., and Cooper, C.W., A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 39:487, 1974.
7. Wells, S.A., Baylin, S.B., Linehan, W.M. et al, Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. **Ann. Surg.** 188:139, 1978.
8. Body J.J. and Heath III, H. Estimates of circulating monomeric calcitonin: physiological studies in normal and thyroidectomized man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 57:897, 1983
9. Tieg R.D., Body J.J., Barta J.M., and Heath III, H. Secretion and metabolism of monomeric human calcitonin: effects of age, sex and thyroid damage. **J. Bone Min. Res.** 1:339,1986.

【生产企业】

生产者名称：美国 **BIOMERICA, INC.**

生产者/生产场所地址：1533 Monrovia Avenue
Newport Beach, CA 92663 U.S.A.

联系方式：(949) 645-2111

传真：(949) 722-6674

网址：www.biomerica.com

电子邮箱：bmra@biomerica.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：010-58895646 020-32293178

传真：010-58895611 020-32293177

电子邮箱：info@rz-biotech.com

网址：www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】

【产品标准编号】

【说明书批准及修改日期】