



НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА (PTH)

Кат. № : EIA-3645
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 18-09-2012
Версия 8.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

1 НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения целостного PTH (паратиреоидного гормона) в человеческой сыворотке. Данный анализ предназначен для использования в диагностике *in vitro*.

2 ПОДВЕДЕНИЕ ИТОГОВ И ОБЪЯСНЕНИЕ

PTH (паратиреоидный гормон, паратгормон, паратирин) синтезируются в передщитовидной железе в качестве предварительного пропаратиреоидного гормона, большого молекулярного предшественника, состоящего из 115 аминокислот. После следует последовательные внутриклеточные расщепления 25-аминокислот, предварительный пропаратиреоидный гормон превращается в промежуточный пропаратиреоидный гормон, полипептид из 90-аминокислот.

При дополнительной протеолитической модификации, пропаратиреоидной гормон затем преобразуется в паратгормон, полипептида из 84 аминокислот. У здоровых людей, регуляция секреции гормона паращитовидных желез обычно осуществляется путем негативного обратного воздействия сыворотки кальция на паращитовидные железы. Интактный PTH является биологически активным и очищает намного быстрее циркуляции, с периодом полураспада менее четырех минут. PTH подвергается протеолизу в паращитовидных железах, но в основном периферийно - особенно в печени, но и в почках и костях, до получения N-терминальных фрагментов и долгоживущего C-терминала и межобластных фрагментов. У пациентов с почечной недостаточностью анализы C-терминала и межобластных PTH, обычно дают повышенные результаты PTH, о чем свидетельствует нарушение почечного очищения.

3 КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Анализ интактного PTH очень важен для дифференциации первичного гиперпаратиреоза от других (не паратиреоидно-опосредованных) форм гиперкальциемии, таких как злокачественные опухоли, саркоидоз и тиреотоксикоз. Измерение паратгормона является наиболее конкретным способом сделать диагноз первичного гиперпаратиреоза. При наличии гиперкальциемии, повышенной уровень паратгормона фактически устанавливает диагноз. В более чем 90% пациентов с первичным гиперпаратиреозом, паратгормон будет повышен. Наиболее распространенными другими факторами гиперкальциемии, а именно гиперкальциемия злокачественной опухоли, связано с понижением уровня паратгормона или PTH в пределах нормы. Когда уровень интактного PTH наносится в зависимости от сыворотки кальция, концентрация интактного PTH у пациентов с гиперкальциемией злокачественной опухоли почти всегда оказывается чрезмерно низкой, когда интерпретируются с учетом повышенного уровня кальция в сыворотке. В отличие от C-терминала и межобластных PTH которые, как правило очень повышены у пациентов с почечной недостаточностью, анализ интактного PTH менее подвержен влиянию снижения функции почек. Значения PTH, как правило, невозможно обнаружить в гипокальциемии вследствие полного гипопаратиреоза, но обнаружены в пределах нормы гипокальциемии из-за частичной потери или ингибирования паращитовидной функции.

4 ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный набор является двухстадийным ELISA для измерения биологической интактной цепи 84 аминокислоты PTH. Он использует два разные козлиные поликлональные антитела к человеческому PTH, очищенными аффинной хроматографией, они являются специфические к молекуле PTH на яичке. Одно антитело

связывается только с средней областью и с-терминальным PTH 39-84 и это антитело является биотинилированное.

Лунка стрептавидина – Биотинилированный анти-PTH (39-84) – Интактный PTH – анти-PTH, анти-PTH, конъюгированные HRP (1-34)

Другое антитело связывается только с N-терминальным PTH 1-34 и это антитело есть меченное пероксидазой хрена для определения. Хотя средняя область и C-терминальные фрагменты связываются биотинальным анти-PTH (39-84), только интактный PTH формирует комплекс сэндвича, необходимый для определения. Способности биотинального антитела и стрептавидин покрытых лунок настроены таким образом, что б уменьшать незначительное влияние неактивных фрагментов, даже при очень высоких уровнях.

В этом анализе калибраторы, контроли или образцы пациентов одновременно инкубируются с энзимно-меченным антителом и биотин парным антителом в стрептавидин-привитой ячейке микропланшета. В конце инкубации микролуны промываются для удаления несвязанного содержимого и привитый энзим к солидной фазе инкубируется с субстратом, ТМБ. Потом добавляется кислый стоп раствор для остановки реакции и обращает цвет на желтый. Интенсивность желтого цвета прямо пропорциональна количеству интактного PTH в образце. Строится кривая единичи абсорбции против концентрации, используя результаты, полученные для калибраторов. Концентрация интактного PTH в контроле и образцах пациента определяется на кривой.

5 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

(См. Таблицу 1).

5.1 НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Микропланшетный считыватель.
- Микропланшетный промыватель (если промыватель не доступен, возможно ручное промывание).
- Точные дозаторы для внесения 25, 100 и 150 мкл.
- (Необязательно): Многоканальный дозатор или многоразовый дозатор на 50, 100 и 150 мкл.

6 ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Хотя реагенты поставляются в специально разработанной упаковке, чтобы содержать компоненты нечеловеческой крови, человеческие образцы пациентов, которые могут быть положительными для антител HBsAg, HBeAg или HIV, должны рассматриваться как потенциально инфицированные биологические опасности. При обращении должны соблюдаться общие меры предосторожности, как и в применении к любому непроверенному образцу пациента.

Стоп раствор содержит 1N серную кислоту. Это сильная кислота. Даже разбавленная она должна использоваться осторожно. Она может вызывать ожог, поэтому, при работе с ней используйте перчатки, защиту для глаз и защитную одежду. При выливании, промойте большим количеством воды. Не вдыхайте испарения.

7 СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Определение интактного PTH должно проводится в ЭДТА плазме или сыворотке. ЭДТА плазма, как описано, демонстрирует улучшенную PTH стабильность при сравнении с сывороткой. Для анализа в дубле необходимо 50 мкл сыворотки или ЭДТА плазмы. Соберите цельную кровь без антикоагулянтов или ЭДТА пробирку. После того как кровь стугилась, необходимо немедленно отделить сыворотку, желательнее в охлажденной центрифуге и хранить при -20°C или ниже. Образцы сыворотки могут храниться при $2-8^{\circ}\text{C}$ 8 часов. Замороженные образцы сыворотки при -20°C стабильны до 4 месяцев.

8 ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Храните все содержимое набора при $2-8^{\circ}\text{C}$ до начала анализа, кроме промывочного концентрата и стоп раствора.

- Все реагенты, кроме ненулевых калибраторов, контролей и промывочного концентрата готовы к использованию. Храните все реагенты при $2-8^{\circ}\text{C}$, кроме промывочного концентрата, который должен храниться при комнатной температуре до разбавления для предотвращения осада.
- Для каждого калибратора (калибраторы A-F) и контролей 1 и 2, разведите каждый флакон 500 мкл реагента 4 (раствор для разведения) и перемешайте. Выдержите флаконы 10 минут и потом смешайте тщательно легкими вращениями до полного растворения. **Используйте калибраторы и контроли сразу после разведения. Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования.** Стандарты и контроли стабильны при -20°C 6 недель после разведения, возможно до трех циклов замораживания / размораживания.

3. Реагент А: **Промывочный концентрат**: аккуратно смешайте содержимое промывочного концентрата. Если есть осадок через хранение при низкой температуре, как 4°C, растворите его в водяной бане при 37°C или вращая его. Добавьте промывочный концентрат (30 мл) в 570 мл дистиллированного или деионизированной воды. Разбавленный промывочный раствор стабилен 90 дней при хранении при комнатной температуре.

9 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите необходимое количество полосок, покрытых стрептавидином в держатель для анализа всех 6 РТН калибраторов (А-Ф), (точная концентрация указана на флаконе), сыворотки контроля качества и образцы пациентов.
2. Раскапайте по **25 мкл** образца в указанные лунки. **Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования.**
3. Внесите по **50 мкл** реагента 1 (биотинилированное антитело) в каждую лунку, что уже содержит образец.
4. Внесите по **50 мкл** реагента 2 (фермент-меченное антитело) в каждую из этих лунок. Накройте микропланшет алюминиевой фольгой или избегайте попадания света и поместите их на орбитальный шейкер или вращатель при 170±10 об/мин на **3 часа ± 30 минут** при комнатной температуре (22-28°C).
5. Сначала аспирируйте жидкость полностью, а потом промойте / аспирируйте каждую лунку 5 раз рабочим моющим раствором (приготовленным из реагента А), используя автоматический микропланшетный промыватель. Объем промывочного раствора должен быть установлен для внесения 0,35 мл в каждую лунку. Добавьте по **150 мкл** реагента В (ТМБ субстрат) в каждую лунку.
7. При необходимом накрытии для предотвращения попадания света, поместите микропланшет на **орбитальный шейкер или вращающее устройство**, установленное на 170±10 об/мин на **30±5 минут** при комнатной температуре (22-28°C).
8. Добавьте по **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку. Тщательно перемешайте.
9. считайте абсорбцию раствора в лунках в течении 10 минут, используя микропланшетный считыватель при **450 нм** против **250 мкл** дистиллированной или деионизированной воды. считайте планшет против считывателя при 405 нм против дистиллированной или деионизированной воды. **Проведите считывание планшета снова при 405 нм** против дистиллированной или деионизированной воды
Примечание: Второе считывание предназначено для установки аналитической оценки калибровочной кривой для величины, представленной наивысшим калибратором, равным приблизительно 700-1000 пг/мл. Следовательно, образцы пациентов с уровнем РТН > 200 пг/мл могут быть вычислены на калибровочной кривой, что содержит считывания до концентрации равной наивысшему калибратору, что используется при 405 нм считывании, от длины волны максимальной абсорбции. В основном, образцы пациентов и контроли должны считываться при использовании считывания при 450 нм для концентрации РТН до 200 пг/мл. Концентрация РТН выше 200 пг/мл должна интерполироваться, используя 405 нм считывание.
10. При использовании конечной абсорбции, полученной в предварительном шаге, постройте калибровочную кривую через кубический сплайн, 4-параметровую логистическую кривую, интерполяцию от точки до точки для количественного определения интактного РТН.

9.1 ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Интактный РТН 1-84 является очень неустойчивой молекулой. Проводите анализ немедленно после разведения или размораживания всех калибраторов, контролей или образцов пациента.
- Рекомендуется анализ калибраторов, контролей и образцов в дубле. Средние единицы абсорбции дублей должны использоваться для уменьшения данных и вычисления результатов.
- Образцы должны пипетироваться в лунки при минимальном образовании пузырей. Для достижения этого «вращайте пипетку» как описано в инструкции производителя пипеток.
- Образцы пациентов со значением выше наивысшего калибратора (калибратора F), что равно приблизительно 700-1000 пг/мл (точная концентрация указана на этикетке флакона), могут быть разбавлены реагентом 3 (разбавитель образцов) и проанализированы повторно. Умножьте результаты на фактор разбавления.
- Не меняйте реагенты разных лотов.
- Если можно, смешайте в равных объемах в достаточном количестве для анализа, реагент 1 (биотинилированное антитело) и реагент 2 (энзимно-меченное антитело) в чистой янтарной бутылке. Потом используйте 100 мкл смешанного антитела для каждой

лунки. Этот альтернативный метод заменяет шаг 3 и 4, потом инкубируйте на орбитальном встряхивателе.

10 ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

А. Ручной метод

1. Для 450 нм считывания, постройте кривую, используя первые пять калибраторов, например калибраторы А, В, С, D, и Е. Для 405 нм считывания, постройте вторую стандартную кривую, используя три калибратора с наивысшей концентрацией, например калибраторы D, Е, и F.
2. Пометьте концентрацию каждого калибратора, указанные на флаконе в пг/мл. Отложите данные калибровочной кривой на линейной бумаге при концентрации на оси X и соответствующей абсорбции на оси Y.
3. Нарисуйте прямую линию между двумя смежными точками. Этот математический алгоритм широко известен как вычисление от точки к точке. Получите концентрацию образца откладывая единицы абсорбции на оси Y и найдите соответствующие концентрации на оси X. Образцы пациентов и контроли должны считываться при 450 нм для концентрации РТН до 200 пг/мл. Концентрация РТН выше 200 пг/мл должна интерполироваться при 405 нм.

В. Автоматизированный метод

Хорошие результаты дают компьютерные программы кубического сплина или 4 параметровой логистики или от точки к точке.

Данные образцов при 450 нм (необработанное А.У. считывание против дистиллированной или деионизированной воды). См. Таблицу 2.

Данные образцов при 405 нм (необработанное А.У. считывание против дистиллированной или деионизированной воды). См. Таблицу 3.

11 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольная сыворотка должна использоваться при каждом анализе. Результаты, полученные при анализе контролей, должны оцениваться при использовании подходящего статистического метода. Результаты анализа, в котором значения контролей находятся за допустимыми границами, считаются недостоверными.

12 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор не показывает побочных эффектов с образцами, обогащенными 2 100 000 пг/мл интактного РТН. Образцы с уровнем РТН выше, чем наивысший калибратор, однако, должны быть разбавлены и повторно проанализированы для получения корректных величин. Как и другие анализы, что используются как диагностические приложения, результаты интактного РТН должны интерпретироваться с осторожностью при соответствии с клинической картиной и другими тестами.

13 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень интактного РТН был вычислен в 148 явно здоровых индивидов данным набором. Полученные значения находились в диапазоне от 9,0 - 94 пг/мл для сыворотки.

Основываясь на статистических тестах асимметрии и эксцесса, популяция при логарифмическом перенесении, следовало нормальное распределение или распределение Гуссена, как показано в гистограмме.

Геометрическое среднее ± 2 стандартных отклонений среднего значения оказалось: 10,4 - 66,5 пг/мл для сыворотки.

14 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Достоверность

309 образцов пациентов со значениями интактного РТН в диапазоне от 1,0-833 пг/мл были проанализированы ELISA процедурой и РТН иммунорадиометрическим анализом. Линейная регрессия предоставила следующие данные:

DRG ELISA = 1,06 – 1,49 пг/мл
r=0,998 N=309

14.2 Чувствительность

Чувствительность или минимально определяемый лимит этого анализа определяется как наименьшее одно значение, которое может быть установлено из нуля при 95% доверительном лимите. Набор РТН ELISA компании ДРГ имеет чувствительность 1,57 пг/мл.

14.3 Специфичность и перекрестная реактивность

Антитела, что используются в этом наборе, были очищены аффинной хроматографией, специально для ячейко-определенных областях на РТН молекуле. Антитело, меченное пероксидазой, использует только N-терминальную область или 1-34 последовательность аминокислоты

PTH молекулы; тогда как биотинилированное антитело специфическое к 39-84 сегментам. Соответственно, только интактный PTH, что требует связывания и энзимным конъюгатом и биотинильным антителом, может определяться в этом анализе.

Для дальнейшего достижения специфичности анализа, конъюгирование и биотинирование и молярный коэффициент, были оптимизированы для минимизации определения фрагментов PTH. Человеческий PTH 1-34 при уровнях до 300 пг/мл и C-терминальный 39-84 фрагмент при уровнях до 300000 пг/мл дали молярную перекрестную реактивность к PTH меньше чем 2% и 0,02% соответственно.

14.4 Точность и восстановление

Точность данного анализа была вычислена из 25 повторных определений для каждого из двух образцов.

Точность внутри анализа

Образец	Среднее значение (пг/мл)	Кол-во	КВ, %
A	32,4	25	6,08
B	178,2	25	3,68

Общая точность данного анализа была вычислена исходя из данных двух образцов, полученных в 21 разных анализах, с реагентами двух разных лотов, за трехнедельный период.

Точность между анализами

Образец	Среднее значение (пг/мл)	Кол-во	КВ, %
---------	--------------------------	--------	-------

Компоненты набора	Описание	Количество
Реагент 1	Биотинилированное антитело PTH	1x7,0 мл
Реагент 2	Антитело PTH, меченное пероксидазой (энзимом)	1x7,0 мл
Реагент B	ТМБ субстрат	1x20 мл
Реагент 3	Растворитель (сыворотка лошади) для образцов пациентов	1x2 мл
Реагент A	ELISA промывочный концентрат (солевой раствор с поверхностно активным веществом)	1x30 мл
Стоп раствор	ELISA стоп раствор (1N серная кислота)	1x20 мл
Реагент 4	Раствор для разведения, содержащий поверхностно активное вещество.	1x5 мл
Микропланшет	Один держатель с стрипами, покрытыми стрептавидимом	12x8 полосок с лунками
Калибраторы A: 0 пг/мл B-F: точные конц. см. на этикетках флаконов	Лиофилизированный (кроме нулевого калибратора) синтетический h-PTH. Нулевой калибратор (BSA раствор с козлиной сывороткой). Другие калибраторы содержат синтетический h-PTH (1-84) в BSA растворе с козлиной сывороткой.	1x0,5 мл на уровень
Контроли 1 и 2 Точные конц. см. на этикетках флаконов	Лиофилизированные. 2 уровни. Синтетический h-PTH (1-84) в BSA растворе с козлиной сывороткой	1x0,5 мл на уровень

Таблица 2

Лунка микропланшета	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица средней абсорбции	Интактный PTH, пг/мл	Интактный PTH пг/мл – результаты для отчета
Калибратор A	0,020	0,016	0,018		0
Калибратор B	0,056	0,051	0,054		7
Калибратор C	0,124	0,119	0,122		18
Калибратор D	0,388	0,393	0,391		55
Калибратор E	1,335	1,340	1,338		210
Контроль 1	0,200	0,200	0,200	27,6	27,6
Контроль 2	0,804	0,794	0,799	119	119
Образец 1	0,147	0,136	0,142	19,1	19,1
Образец 2	0,407	0,409	0,408	58,5	58,5
Образец 3	2,375	2,454	2,415	>200	*
Образец 4	3,725	3,725	3,725	>200	*

*Поскольку считанная концентрация >200 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 405 нм, как показано в таблице данных при 405 нм.

Таблица 3

Лунки микропланшета	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица средней абсорбции	Интактный PTH, пг/мл	Интактный PTH пг/мл – результаты для отчета
Калибратор A	0,014	0,008	0,011		0
Калибратор D	0,124	0,128	0,126		55
Калибратор E	0,428	0,425	0,427		210
Калибратор F	1,309	1,317	1,313		700
Контроль 1	0,074	0,066	0,070	<200	π
Контроль 2	0,260	0,251	0,256	121	π
Образец 1	0,049	0,043	0,046	<200	π

A	30,3	21	3,6
B	159,1	21	2,8

14.5 Восстановление

Разное количество PTH было добавлено к трем разным сывороткам пациента для определения восстановления. Результаты показаны в Таблице 4.

14.6 Линейность разбавлений образцов пациентов: параллелизм

Четыре образца пациента были разбавлены реагентом 4 (разбавитель для образцов пациентов, что выходят за границы). Результаты в пг/мл показаны в Таблице 5.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ООО «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: +38 (0342) 77 51 22
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com

Таблица 1

Образец 2	0,132	0,133	0,133	<200	¶
Образец 3	0,758	0,782	0,770	401	401
Образец 4	1,314	1,321	1,318	>700	<=

¶ Для образцов при считывании <200 пг/мл, рекомендуется использовать данные, полученные при 450 нм, как показано в таблице данных при 450 нм. Эта практика даст результаты с оптимальной чувствительностью.

π – хотя считывания для контроля 2 < 200 пг/мл, рекомендуется, что б актуальные результаты были считаны и записаны для оценки контроля качества. Абсорбция контроля 2 является достаточно высокой для аналитической оценки.

<= - абсорбция считывания выходит за границы или превышает среднюю абсорбцию наивысшего калибратора. Образцы необходимо анализировать при разбавлении.

Примечание: Представленные данные используются только для иллюстрации и не должны использоваться как результаты анализа.

Таблица 4

Образец сыворотки	Эндогенный PTH (пг/мл)	PTH добавленный (пг/мл)	Ожидаемое значение (пг/мл)	Измеренное значение (пг/мл)	Восстановление (%)
A	32,7	132	165	168	102
	20,6	264	285	288	101
	13,5	396	410	413	101
B	68,6	132	201	191	95
	51,7	264	316	344	109
	45,0	396	441	462	105
C	19,9	132	152	165	109
	15,4	264	279	275	99
	13,3	396	409	424	104

Среднее 103%

Таблица 5

Образец	Разбавление	Ожидаемые	Полученные	% Полученных / Ожидаемых
A	Неразбавленный	-	322	-
	1:2	161	148	92
	1:4	80,5	73,1	91
	1:8	40,3	41,5	103
B	Неразбавленный	-	230	-
	1:2	115	97	84
	1:4	58	55	95
	1:8	29	30	103
C	Неразбавленный	-	176	-
	1:2	88	82	93
	1:4	44	45	102
	1:8	22	24	109
D	Неразбавленный	-	426	-
	1:2	213	192	90
	1:4	107	90	84
	1:8	53	47	89

Среднее 95%