НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТАКТНОГО ПАРАТИРЕОЇДНОГО ГОРМОНУ (PTH)

1735-6, Intact PTH

Каталог. №: ***1735-6*** *Методика від* ***07-09-2013***
Кількість : ***96***
Виробник : ***DAI, (США)***

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

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	**96 тестів**
Тест	**Intact PTH ELISA**
Метод	**Імуносорбентний аналіз ІФА**
Принцип	**ІФА – непрямий; планшет, покритий антигеном**
Діапазон визначення	**Кількісний**
Зразок	**25 мкл сироватки**
Специфічність	**100 %**
Чутливість	**1.57 пг/мл**
Загальний час	**~ 3 години 40 хвилин**
Термін придатності	**12 місяців від дати виробництва**

** Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийняті до уваги.*

ПРИЗНАЧЕННЯ
Набір DAI Intact-PTH ELISA призначений кількісного визначення інтактного ПТГ (паратиреоїдного гормону) у сироватці крові людини. Цей тест призначений для діагностики In Vitro.

РЕЗЮМЕ І ОПИС *(Див. оригінал інструкції).*

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ *(Див. оригінал інструкції).*

ПРИНЦИП ТЕСТУ
DAI інтактного ПТГ є двохсайтовим імуноаналізом ІФА [твердофазовий імуноферментний аналіз] для визначення концентрації біологічно недоторканого 84 амінокислотного ланцюга ПТГ. Два різних козячих поліклональних антитіла до людського ПТГ були очищені за допомогою афінної хроматографії, і є специфічними до певних областей молекули ПТГ. Одне антитіло готове зв'язувати тільки середню область і С-кінцеві PTH 39-84, і це антитіло є біотинильованим.

Лунка Стрептавідину – Біотинильоване анти-PTH (39-84) – Інтактний PTH – Анти-PTH, кон'югований з HRP (1-34)

Інше антитіло готові зв'язуватися тільки з N-кінцевим ПТГ 1-34 і це антитіло мічене пероксидазою хрону для виявлення. Хоча фрагменти середнього регіону і С-кінцеві фрагменти пов'язані біотинильованим анти-PTH (39-84), тільки ПТГ 1-84 формує сандвіч-комплекс, необхідний для виявлення. Пропускні здатності обох біотинильованого антитіла і покритої Стрептавідином мікролунки були скориговані таким чином, щоб виявляти незначне втручання неактивних фрагментів, навіть при дуже підвищених рівнях.
У цьому аналізі калібратори, контролі і зразки пацієнтів одночасно інкубують з міченим ферментом антитілом і антитілом, зв'язаним з біотином, в лунці мікропланшета, покритій Стрептавідином. Наприкінці аналізу інкубації лунки промивають для видалення незв'язаних компонентів і фермент-зв'язаних з твердою фазою, інкубують з субстратом тетраметилбензидина (TMB). Потім додається Кислий розчин для зупинки реакції і колір міняється на жовтий. Інтенсивність жовтого забарвлення прямо пропорційна концентрації інтактного ПТГ у зразку. Будується калібрувальна крива з використанням результатів, отриманих при аналізі калібратора. Концентрації інтактного PTH в контролях і зразках пацієнтів визначаються безпосередньо з цієї кривої.

КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

Компонент	Назва	Кіл-ть
Реагент 1	Біотинильоване антитіло PTH	1 x 7.0 мл
Реагент 2	Антитіло PTH, мічене Пероксидазою	1 x 7.0 мл
Реагент B	TMB Субстрат	1 x 20 мл
Реагент 3	Розчинник [сироватка коней] для зразків пацієнтів	1 x 2 мл
Реагент A	Концентрат Промивного Розчину [фізіологічний розчин, що містить поверхнево-активні речовини]	1 x 30 мл
Стоп Розчин	Стоп Розчин [1N сірчаної кислоти]	1 x 20 мл
Реагент 4	Відновлювальний Розчин, що містить поверхнево-активні речовини	1 x 5 мл
Мікропланшет	Один тримач зі смужками, покритими Стрептавідином	12x8 лунок
Калібратори: **A:** 0 пг/мл **B-F:** див. етикетки	Ліофілізований синтетичний л-ПТГ. Ліофілізований 0 Калібратор [Розчин БСА з козячою сироваткою]. Всі інші калібратори складаються з синтетичних л-ПТГ (1-84) в розчині БСА з козячої сироватки.	1 x 0.5 мл/рівень
Контролі 1 і 2 Див. етикетки	Ліофілізований. 2 рівня. Синтетичний л-ПТГ (1-84) в Розчині BSA з козячої сироватки.	1 x 0.5 мл/рівень

МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ
- Мікропланшетний зчитувач.
- Мікропланшетний вошер (якщо вошер недоступний, ручне промивання може бути прийнятним).
- Піпетки прецизійні на 25, 100 і 150 мкл.
- (*Опційно*): Багатоканальний дозатор або повторюваний Диспенсер для 50, 100 і 150 мкл.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ДЛЯ КОРИСТУВАЧІВ
Хоча реагенти в цьому комплекті були спеціально розроблені, щоб не містити компонентів крові людини, зразки пацієнтів, які можуть бути позитивними на HBsAg, HBcAg або антитіла до ВІЛ, повинні розглядатися як потенційно інфіковані. Дотримуватись загальних запобіжних заходів.
Стоп-розчин містить 1 N Сірчаної Кислоти. Це сильна кислота. Навіть з розбавленою, з нею необхідно поводитись з обережністю. Це може призвести до опіків; необхідно використовувати рукавички та захисні окуляри та відповідний захисний одяг. Будь-який розлив слід протерти негайно з великою кількістю води. Не вдихати пару і уникнути вдихання.

ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ
Визначення інтактного ПТГ повинно бути виконано з використанням ЕДТА плазми або сироватки. ЕДТА плазма демонструє поліпшену стабільність PTH в порівнянні з сироваткою[6]. Для аналізу зразка у двох примірниках, необхідно 50 мкл сироватки або плазми ЕДТА. Зберіть цільну кров в пробірку без антикоагулянту. Після утворення згустків, відокремити сироватку або плазму за допомогою охолодженої центрифуги і зберігати при -20 °C або нижче. Зразки сироватки можуть зберігатися до 8 годин при температурі 2-8 °C. Зразки сироватки в замороженому вигляді при -20 °C стабільні протягом 4 місяців.

ПІДГОТОВКА І ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ
Зберігати всі компоненти набору при температурі 2- 8 °C, крім Промивального концентрату і Стоп-розчину після отримання до використання.
1. Всі реагенти, крім калібраторів, контролю та промивального концентрату готові до використання. Зберігайте всі реагенти при 2- 8 °C, крім промивального концентрату, який слід зберігати при кімнатній температурі до розведення щоб уникнути випадання осаду.
2. Для кожного з калібраторів (калібратори A-F) і контролів 1 і 2, відновити кожен флакон з 500 мкл Реагенту 4 (Розчин для відтворення) і перемішати. Залишити флакони на 10 хвилин, а потім ретельно перемішати, обережно перевертаючи, до повного розчинення. ***Використовуйте калібратори і контролі якомога швидше після відновлення. Заморозити (при -20 °C) залишок калібраторів і контролей якомога швидше після використання.*** Стандарти та контролі стабільні при – 20 °C протягом 6 тижнів після відновлення до 3 циклів заморожування-відтавання при роботі з ними, як рекомендовано в розділі "Процедурні зауваження".
3. Реагент A: Промивний концентрат: Змішайте вміст промивного концентрату ретельно. Якщо осад присутній у флаконі з концентратом через зберігання при зниженій температурі, наприклад, 4 °C, розчинити його, помістивши флакон на водяну баню при 37 °C або в термостат, збовтуючи або перемішуючи. Додати концентрат розчину для промивання (30 мл) до 570 мл дистильованої або деіонізованої води і перемішати. Розведений

робочий промивний розчин стабільний протягом 90 днів при зберіганні при кімнатній температурі.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Помістити достатню кількість **смужок** у тримач для запуску всіх шести (6) PTH калібраторів, A-F [точна концентрація вказана на етикетці флакона], Контрольних сироваток і зразків.
2. Внести **25 мкл** зразка в призначену лунку. ***Заморозити (при -20 °C) залишки калібраторів і контролів якомога швидше після використання.***
3. Внести **50 мкл** Реагенту 1 (Біотинильоване Антитіло) в кожну з лунок, які вже містять зразок.
4. Внести **50 мкл** Реагенту 2 (Мічене ферментом антитіло) в кожну з тих же лунок. Накрити планшет(и) алюмінієвою фольгою або кришкою для запобігання попадання світла, і помістити його на **орбітальний шейкер** при швидкості обертання 170 ± 10 об/хв протягом **3 годин** ± 30 хвилин при кімнатній температурі (22- 28 °C).
5. Спочатку повністю видалити рідину, а потім вимити/аспірувати кожну лунку 5 (п'ять) разів робочим розчином для промивання (приготованим з реагенту A), використовуючи автоматичний промивний пристрій мікропланшетів. Об'єм розчину для промивання має бути встановлений для дозування 0,35 мл у кожну лунку.
6. Додати **150 мкл** Реагенту B (TMB субстрат) в кожну з лунок.
7. З відповідним накриванням для запобігання попадання світла, помістити планшет(и) на **орбітальний шейкер** при 170±10 об/хв протягом **30±5 хвилин** при кімнатній температурі (22- 28 °C).
8. Додати **100 мкл** стоп-розчину в кожну лунку. Обережно перемішати.
9. Виміряти оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин за допомогою мікропланшетного рідера, встановленого на **450 нм** проти **250 мкл** дистильованої води. **Знову зчитати результати** з читачем, встановленим на **405 нм** проти дистильованої води.
   Примітка: друге читання призначено для підвищення аналітичної точності калібрувальної кривої, щоб значення, представлене максимальним калібратором, що становить приблизно 700-1000 пг/мл. Таким чином, зразки пацієнтів з ПТГ > 200 пг/мл, можуть бути визначені кількісно з калібрувальної кривої, що складається з усіх показань, аж до концентрації, еквівалентній максимальному калібратору, з використанням 405 нм, незалежно від довжини хвилі максимальної абсорбції. Загалом, зразки пацієнтів і контрольні зразки слід вимірювати при 450 нм для концентрацій ПТГ до 200 пг/мл. Зразки з ПТГ вище 200 пг/мл повинні бути інтерпольовані з використанням довжини хвилі 405 нм.
10. Використовуючи кінцеві значення оптичної щільності, отримані на попередньому етапі, побудувати калібрувальну криву за допомогою кубічного сплайна, 4-параметричної логістики або точка-точка інтерполяції для кількісної оцінки концентрації ПТГ.

ПРОЦЕДУРНІ ЗАУВАЖЕННЯ

- Інтактний ПТГ 1-84 є дуже нестійкою молекулою. Розпочати аналіз відразу ж після відновлення або відтавання всіх калібраторів, контролей і зразків пацієнтів.
- Рекомендується, щоб всі калібратори, контролі і зразки пацієнтів аналізувались у дублікатах. Значення середніх оптичних щільностей дублюючих наборів повинні бути використані для зменшення даних та обчислення результатів.
- Зразки слід піпетувати в лунки з мінімальною кількістю бульбашок повітря. Щоб добитися цього, рекомендується використання "зворотньої піпетки", описаної в листку-вкладиші виробника.
- Зразки пацієнтів зі значеннями більше, ніж найвищий калібратор (калібратор F), що становить приблизно 700-1000 пг/мл (див. точну концентрацію на етикетці флакона), можуть бути розведені Реагентом 3 (Розчинник зразків) і аналізовані повторно. Результат помножити на коефіцієнт розведення.
- Не змішувати реагенти з різних серій.
- При бажанні, змішати в рівних обсягах, в достатній кількості для аналізу, Реагент 1 (Біотинильоване антитіло) і Реагент 2 (мічене ферментом антитіло) в чистому бурштиновому флаконі, а потім використовувати 100 мкл змішаних антитіл для кожної лунки. Цей альтернативний метод повинен замінити кроки (3) і (4), після чого буде проведена інкубація на орбітальному шейкері.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Ручний метод

1. Для зчитування при 450 нм побудувати калібрувальну криву за допомогою перших п'яти калібраторів, тобто калібраторів A, B, C, D і E. Для зчитування при 405 нм побудувати другу калібрувальну криву, використовуючи три калібратора з найбільшою концентрацією, тобто калібратори D, E і F.
2. Уточнити концентрацію кожного калібратора, зазначену на флаконі, в пг/мл. Відкласти дані з калібрувальної кривої на міліметровому папері з концентрацією по осі X і відповідною A.U. на Y-осі.
3. Намалюйте пряму лінію між 2 сусідніми точками. Цей математичний алгоритм широко відомий як розрахунок "точка-точка". Отримати концентрацію зразка шляхом розміщення одиниць поглинання на Y-осі і знайти відповідне значення концентрації на осі абсцис. Зразки пацієнтів і контрольні зразки слід вимірювати при 450 нм з концентрацією ПТГ до 200 пг/мл. Концентрації PTH вище 200 пг/мл слід інтерполювати з використанням довжини хвилі 405 нм.

Автоматизований метод

Використання комп'ютерних програм з кубічним сплайном або 4 PL [4-Параметрова Логістика] зазвичай дає хороші результати.

Приклад розрахунку *при 450 нм* [зчитування необроблених A.U. проти дистильованої або деіонізованої води]

Microplate Well	1st Reading Absorbance Unit	2nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	Intact PTH pg/mL	Intact PTH pg/mL – Result to report
Calibrator A	0.020	0.016	0.018		0
Calibrator B	0.056	0.051	0.054		7
Calibrator C	0.124	0.119	0.122		18
Calibrator D	0.388	0.393	0.391		55
Calibrator E	1.335	1.340	1.338		210
Control 1	0.200	0.200	0.200	27.6	27.6
Control 2	0.804	0.794	0.799	119	119
Patient Sample 1	0.147	0.136	0.142	19.1	19.1
Patient Sample 2	0.407	0.409	0.408	56.5	56.5
Patient Sample 3	2.375	2.454	2.415	> 200	*
Patient Sample 4	3.725	3.725	3.725	> 200	*

* Оскільки значення концентрації > 200 пг/мл, рекомендується використовувати дані, отримані при 405 нм, як показано в **Прикладі розрахунку** *при 405 нм* в таблиці нижче.

Приклад розрахунку *при 405 нм* [зчитування необроблених A.U. проти дистильованої або деіонізованої води]

Microplate Well	1st Reading Absorbance Unit	2nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	Intact PTH pg/mL	Intact PTH pg/mL – Result to report
Calibrator A	0.014	0.008	0.011		0
Calibrator D	0.124	0.128	0.126		55
Calibrator E	0.428	0.425	0.427		210
Calibrator F	1.309	1.317	1.313		700
Control 1	0.074	0.066	0.070	< 200	¶
Control 2	0.260	0.251	0.256	121	¶
Patient Sample 1	0.049	0.043	0.046	< 200	¶
Patient Sample 2	0.132	0.133	0.133	< 200	¶
Patient Sample 3	0.758	0.782	0.770	401	401
Patient Sample 4	1.314	1.321	1.318	> 700	⇐

Для зразків з концентрацією < 200 пг/мл, рекомендується використовувати дані, отримані при 450 нм, як показано в **Прикладі розрахунку** *при 450 нм* в таблиці вище. Ця практика повинна дати результати з оптимальної чутливості аналізу.
Хоча результат для Контролю (2) < 200 пг/мл, рекомендується, щоб фактичний результат був зчитаний і записаний для оцінки Контролю якості. Крім того, абсорбція для Контролю 2 є досить високою, щоб бути аналітично дійсною.

ПРИМІТКА: Дані, наведені вище, призначені тільки для ілюстрації і не повинні використовуватись замість даних, отриманих під час аналізу.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Контрольна сироватка або сироваткові пули повинні бути проаналізовані з кожним аналізом калібраторів і зразків. Результати, отримані на основі аналізу контрольних зразків, слід оцінювати за допомогою відповідних статистичних методів. В аналізах, в яких одне або більше значень якості контрольного зразка лежать поза допустимих меж, результати для зразка пацієнта не можуть бути задіяні.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Набір DAI PTH ІФА не проявив ніякого "Ефекту Прозони " із зразками, збагаченими 2,100,000 пг/мл інтактного ПТГ. Зразки з рівнями інтактного ПТГ більше максимального калібратора, однак, повинні бути розведені і досліджені повторно для отримання коректних

значень. Як і з використанням будь-якого аналіту в цілях діагностики, результати Intact PTH повинні інтерпретуватися разом з загальними клінічними та іншими лабораторними дослідженнями.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рівні інтактного ПТГ були виміряні у взірцях 148 нормальних людей в США за допомогою Intact PTH ELISA. Отримані значення коливалися від 9.0 до 94.0 пг/мл. На основі статистичних експериментів асиметрії та ексцесу, населення при трансформації логарифмічно, слідує наступним нормальному або гаусовому розподілам. Середнє геометричне значення ± 2 стандартних відхилення від середнього дало результати від 10.4 до 66.5 пг/мл.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точність

Триста дев'ять (309) зразків пацієнтів зі значеннями ПТГ в діапазоні від 1.0 до 833 пг/мл, аналізували за методикою ELISA і PTH іммунорадіометричного аналізу. Лінійний регресійний аналіз дає такі статистичні дані:

DAI ELISA = 1.06 – 1.49 pg/mL r = 0.998 N = 309

Чутливість

Чутливість, або мінімальна межа виявлення, цього аналізу визначається як найменше одиночне значення, яке можна відрізнити від нуля з довірчим інтервалом 95 %. DAI PTH ELISA має розрахункову чутливість 1.57 пг/мл.

Специфічність і Перехресна реактивність

Антитіла, використані в даному аналізі, були очищені за допомогою афінної хроматографії, і є специфічними до областей на молекули ПТГ. Мічені пероксидазою антитіла розпізнають тільки N-кінцеву область або 1-34 амінокислотну послідовність молекули ПТГ; тоді як біотинильовані антитіла є специфічними до 39-84 сегмента. Відповідно, тільки інтактні ПТГ, потребують зв'язування як кон'югованого з ферментом антитіла, так і біотинильованого антитіла, можуть бути виявлені в цьому аналізі.
Для подальшого досягнення Специфічності цього аналізу, кон'югація і біотинилювання та молярне співвідношення були оптимізовані, щоб мінімізувати виявлення фрагментів PTH. 1-34 ПТГ людини на рівнях до 300 пг/мл і С-кінцевий фрагмент 39-84 на рівнях до 300,000 пг/мл дає молярні перехресні реакції з ПТГ менше 2% і 0.02 % відповідно.

Точність і Відтворюваність

Точність (всередині аналізу) DAI PTH ELISA була розрахована з 25 повторних визначень на кожному з двох зразків.

Варіація в аналізі

Sample	Mean Value (pg/mL)	N	Coefficient of variation %
A	32.4	25	6.08%
B	178.2	25	3.68%

Загальна точність (між серіями) DAI PTH ELISA була розрахована за результатами даних аналізу двох зразків, отриманих у 21 різних аналізах, трьома техніками у двох різних партіях реагентів, протягом трьох тижнів.

Варіація між аналізами

Sample	Mean Value (pg/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	30.3	21	3.6
B	159.1	21	2.8

Відновлення

Різні кількості PTH були додані до трьох різних сироваток пацієнтів для визначення відновлення. Отримані результати представлені в наступній таблиці:

Serum Sample	PTH Endogenous (pg/ml)	PTH added (pg/ml)	Expected Value (pg/ml)	Measured Value (pg/ml)	Recovery (%)
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 %

Середнє значення 103%

Лінійність розведення зразка пацієнта: паралелізм

Чотири зразки сироватки розбавляли Реагентом 3 (Розчинник для зразків пацієнта). Результати в пг/мл, показані нижче:

Sample	Dilution	Expected	Observed	% Observed ÷ Expected
A	Undiluted	-	322	-
	1:2	161	148	92 %
	1:4	80.5	73.1	91 %
	1:8	40.3	41.5	103 %
B	Undiluted	-	230	-
	1:2	115	97	84 %
	1:4	58	55	95 %
	1:8	29	30	103 %
C	Undiluted	-	176	-
	1:2	88	82	93 %
	1:4	44	45	102 %
	1:8	22	24	109 %
D	Undiluted	-	426	-
	1:2	213	192	90 %
	1:4	107	90	84 %
	1:8	53	47	89 %

Середнє значення 95%

ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»