



Набор для определения ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА (PTH)

Кат. № : 106-3645
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 19-10-2007

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

I. НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

Ячейка стрептавидина – Биотинилированный анти-PTH (39-84) – Интактный PTH – анти-PTH, конъюгированный 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 С-терминальные фрагменты связываются биотинальным анти-PTH (39-84), только интактный PTH формирует комплекс сэндвича, необходимый для определения. Способности биотинального антитела и стрептавидин покрытых ячеек 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 микроячейки промываются для удаления несвязанного содержимого и привитый энзим к солидной фазе инкубируется с субстратом, ТМВ. Потом добавляется кислый стоп раствор для остановки реакции и образует цвет на желтый. Интенсивность желтого цвета прямо пропорциональна количеству интактного PTH в образце. Строится кривая единиц абсорбции против концентрации, используя результаты, полученные для калибраторов. Концентрация интактного PTH в контроле и образцах пациента определяется на кривой.

V. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

(См. Таблицу 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 многократный дозатор на 50, 100 и 150 мкл.

VI. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

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

VII. СБОР И ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ

Определение интактного PTH должно проводится в EDTA плазме или сыворотке. EDTA плазма, как описано, демонстрирует улучшенную PTH стабильность при сравнении с сывороткой. Для анализа в дубле необходимо 50 мкл сыворотки или EDTA плазмы. Соберите цельную кровь без антикоагулянтов или EDTA пробирку. После того как кровь сгустилась, необходимо немедленно отделить сыворотку, желательна 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.

VIII. ПРИГОТОВЛЕНИЕ 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 ненулевого калибратора (калибраторы А-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 / оттаивания.
- Реагент А: Промывочный концентрат: аккуратно смешайте содержимое промывочного концентрата. Если есть осад через хранение при низкой температуре, 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.

IX. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Поместите необходимое количество полосок, покрытых стрептавидином в держатель для анализа всех 6 PTH калибраторов (А-F), (точная концентрация указана на флаконе), сыворотки контроля качества и образцы пациентов.
- Раскапайте **25 мкл** образца в указанные ячейки. **Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования.**
- Внесите **50 мкл** реагента 1 (биотинилированное антитело) в каждую ячейку, что уже содержит образец.
- Внесите **50 мкл** реагента 2 (энзимно-меченное антитело) в каждую из этих ячеек. Накройте микропланшет алюминиевой фольгой или избегайте попадания света и поместите их на орбитальный встряхиватель или ротатор при $170+10$ об/мин на **3 часа \pm 30 минут** при комнатной температуре ($22-28^{\circ}\text{C}$).
- Сначала аспирируйте жидкость полностью, а потом промойте / аспирируйте каждую ячейку 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 ячейку.
- Добавьте **150 мкл** реагента В (ТМВ субстрат) в каждую ячейку.
- При необходимом накрытии для предотвращения попадания света, поместите микропланшет на **орбитальный встряхиватель или вращающее устройство**, установленное на $170+10$ об/мин на **30 ± 5 минут** при комнатной температуре ($22-28^{\circ}\text{C}$).
- Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку. Тщательно перемешайте.
- Считайте абсорбцию раствора в ячейках 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 PTH > 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 PTH до 200 пг/мл. Концентрация PTH выше 200 пг/мл должна интерполироваться, используя 405 нм считывание.
- При использовании конечной абсорбции, полученной в предварительном шаге, постройте калибровочную кривую через кубический сплин, 4 параметровую логику, интерполяцию от точки до точки для количественного определения интактного PTH.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Интактный РТН 1-84 является очень неустойчивой молекулой. Проводите анализ немедленно после разведения или оттаивания 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 ячейки 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 ячейки. Этот альтернативный метод заменяет шаг 3 и 4, потом инкубируйте на орбитальном встряхивателе.

X. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**Ручной метод**

1. Для 450 нм считывания, постройте кривую, используя первые пять калибраторов, например калибраторы А, В, С, D, и E. Для 405 нм считывания, постройте вторую стандартную кривую, используя три калибратора с наивысшей концентрацией, например калибраторы D, E, 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.

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.

XI. 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.

XII. ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор не показывает побочных эффектов с образцами, обогащенными 1000000 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 аналиты, что используются как диагностические приложения, результаты интактного РТН должны интерпретироваться с осторожностью при соответствии с клинической картиной и другими тестами.

XIII. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень интактного РТН был вычислен в 59 очевидно здоровых индивидов данным набором. Полученные значения, находятся в диапазоне 8,6-76,6 пг/мл. Основываясь на статистических тестах асимметрии и эксцесса, популяция при логарифмическом перенесении, следовало нормальное распределение или распределение Гуссена, как показано в гистограмме. Геометрическое

среднее \pm 2 стандартных отклонений средних было вычислено 8,3 – 68,0 пг/мл.

XIV. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Достоверность**

223 образцов пациентов со значениями интактного РТН в диапазоне от 7,5 - 1046 пг/мл были проанализированы ELISA процедурой и РТН иммунорадиометрическим анализом. Линейная регрессия предоставила следующие данные:

$$\text{DRG ELISA} = 1,058 + 3,4 \text{ пг/мл} \\ r=0,997 \quad N=223$$

Чувствительность

Чувствительность или минимально определяемый лимит этого анализа определяется как наименьшее одно значение, которое может быть установлено из нуля при 95% доверительном лимите. DRG кальцитонин ELISA имеет чувствительность 1,72 пг/мл.

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 РТН молекулы; тогда как биотинилированное антитело специфическое к 39-84 сегментам. Соответственно, только интактный РТН, 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 РТН. Человеческий РТН 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 РТН меньше чем 2% и 0,02% соответственно.

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	47,7	25	3,0
B	265,0	25	2,8

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

Точность между анализами

Образец	Среднее значение (пг/мл)	Кол-во	КВ, %
A	52,6	21	5,1
B	272,0	21	5,5

Восстановление

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

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:

ЧМП «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

Компоненты набора	Описание	Количество
Реагент 1	Биотинилированное антитело РТН	1x5,4 мл
Реагент 2	Антитело РТН, меченное пероксидазой (энзимом)	1x5,4 мл
Реагент В	TMB субстрат	1x15 мл
Реагент 3	Растворитель (сыворотка лошади) для образцов пациентов	1x2 мл
Реагент А	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 А: 0 пг/мл В: С: Точные D: конц. см. Е: на этикетках F: 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

Ячейка микропланшета	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица средней абсорбции	Интактный РТН, пг/мл	Интактный РТН пг/мл – результаты для отчета
Калибратор А	0,020	0,016	0,018		0
Калибратор В	0,056	0,051	0,054		7
Калибратор С	0,124	0,119	0,122		18
Калибратор D	0,388	0,393	0,391		55
Калибратор Е	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

Ячейки микропланшета	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица абсорбции 1-го считывания	Единица средней абсорбции	Интактный РТН, пг/мл	Интактный РТН пг/мл – результаты для отчета
Калибратор А	0,014	0,008	0,011		0
Калибратор D	0,124	0,128	0,126		55
Калибратор Е	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	¶
Контроль 2	0,260	0,251	0,256	121	П
Образец 1	0,049	0,043	0,046	<200	¶
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.

П – 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

<u>Образец сыворотки</u>	<u>Эндогенный PTH (пг/мл)</u>	<u>PTH добавленный (пг/мл)</u>	<u>Ожидаемое значение (пг/мл)</u>	<u>Измеренное значение (пг/мл)</u>	<u>Восстановление (%)</u>
A	51,1	132	183	185	101
	51,2	264	315	320	102
	51,0	396	447	453	101
B	306	132	438	415	95
	310	264	574	523	91
	312	396	708	632	89
C	279	132	411	390	95
	282	264	546	501	92
	280	396	679	613	90

Таблица 5

<u>Образец</u>	<u>Разбавление</u>	<u>Ожидаемые</u>	<u>Полученные</u>	<u>% Полученных / Ожидаемых</u>
A	Неразбавленный	-	415	-
	1:2	208	175	84
	1:4	104	89	86
	1:8	52	51,5	99
B	Неразбавленный	-	600	-
	1:2	300	281	94
	1:4	150	134	89
	1:8	75	76	101
C	Неразбавленный	-	687	-
	1:2	344	335	97
	1:4	172	169	98
	1:8	85,9	87,7	102
D	Неразбавленный	-	566	-
	1:2	283	255	90
	1:4	142	121	85
	1:8	70,8	67	95