

Instructions for Use

PTH (Parathyroid) Intact ELISA

IVD



REF EIA-3645

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Sommaire

1	NAME AND INTENDED USE.....	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION	3
3	CLINICAL SIGNIFICANCE.....	3
4	PRINCIPLE OF THE TEST	3
5	KIT COMPONENTS.....	4
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS	4
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE.....	4
8	REAGENT PREPARATION AND STORAGE	5
9	ASSAY PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11	QUALITY CONTROL	7
12	LIMITATIONS OF PROCEDURE.....	7
13	EXPECTED VALUES.....	7
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
1	BESTIMMUNGSGEMÄSSE ANWENDUNG	10
2	EINFÜHRUNG UND BESCHREIBUNG	10
3	KLINISCHE BEDEUTUNG	10
4	TESTPRINZIP.....	10
5	TESTKIT-KOMPONENTEN	11
6	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	11
7	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG	12
8	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	12
9	TESTVERFAHREN	13
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
11	QUALITÄTSKONTROLLE.....	15
12	GRENZEN DES VERFAHRENS	15
13	ERWARTETE WERTE.....	16
14	LEISTUNGSMERKMALE.....	16
1	USO PREVISTO	18
2	RIEPILOGO E SPIEGAZIONE.....	18
3	SIGNIFICATO CLINICO	18
4	PRINCIPIO DEL TEST.....	18
5	COMPONENTI DEL KIT	19
6	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	19
7	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	19
8	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE	20
9	PROCEDURA DI ANALISI	20
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	21
11	CONTROLLO QUALITÀ.....	22
12	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA	22
13	VALORI PREVISTI.....	23
14	ATTERISTICHE DELLA PROCEDURA	23

1	USO PREVISTO	25
2	RESUMEN Y EXPLICACIÓN	25
3	SIGNIFICACIÓN CLÍNICA	25
4	PRINCIPIO DE LA PRUEBA	25
5	COMPONENTES DEL KIT	26
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS	26
7	RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	27
8	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO	27
9	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	28
10	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	29
11	CONTROL DE CALIDAD	30
12	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	30
13	VALORES PREVISTOS	30
14	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	31
1	APPLICATION	33
2	RÉSUMÉ EXPLICATIF	33
3	IMPORTANCE CLINIQUE	33
4	PRINCIPE DU TEST	33
5	COMPOSANTS DE LA TROUSSE	34
6	AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	34
7	PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	35
8	PRÉPARATION ET STOCKAGE DES RÉACTIFS	35
9	PROCÉDURE DE DOSAGE	35
10	CALCUL DES RÉSULTATS	36
11	CONTRÔLE QUALITÉ	37
12	LIMITES DE LA PROCÉDURE	38
13	VALEURS ATTENDUES	38
14	CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES	38
15	REFERENCES / LITERATURE	41
	SYMBOLS USED	42

1 NAME AND INTENDED USE

The PTH (Parathyroid) Intact ELISA is intended for the quantitative determination of Intact-PTH (Parathyroid Hormone) in human serum.

This assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

PTH (Parathyroid hormone, Parathormone, Parathyrin) is biosynthesized in the parathyroid gland as a pre-proparathyroid hormone, a larger molecular precursor consisting of 115 amino acids. Following sequential intracellular cleavage of a 25-amino acid sequence, preproparathyroid hormone is converted to an intermediate, a 90-amino acid polypeptide, parathyroid hormone. With additional proteolytic modification, parathyroid hormone is then converted to parathyroid hormone, an 84 amino acid polypeptide. In healthy individuals, regulation of parathyroid hormone secretion normally occurs via a negative feedback action of serum calcium on the parathyroid glands. Intact PTH is biologically active and clears very rapidly from the circulation with a half-life of less than four minutes¹. PTH undergoes proteolysis in the parathyroid glands, but mostly peripherally, particularly in the liver but also in the kidneys and bone, to give N-terminal fragments and longer lived C-terminal and midregion fragments. In subjects with renal insufficiency, C-terminal and midregion PTH assays typically give elevated PTH results, as reflected by impaired renal clearance².

3 CLINICAL SIGNIFICANCE

Intact PTH assays are important for the differentiation of primary hyperparathyroidism from other (non-parathyroid-mediated) forms of hypercalcemia, such as malignancy, sarcoidosis and thyrotoxicosis². The measurement of parathyroid hormone is the most specific way of making the diagnosis of primary hyperparathyroidism. In the presence of hypercalcemia, an elevated level of parathyroid hormone virtually establishes the diagnosis. In over 90% of patients with primary hyperparathyroidism, the parathyroid hormone will be elevated³.

The most common other cause of hypercalcemia, namely hypercalcemia of malignancy, is associated with suppressed levels of parathyroid hormone³ or PTH levels within the normal range⁴. When intact PTH level is plotted against serum calcium, the intact PTH concentration for patients with hypercalcemia of malignancy is almost always found to be inappropriately low when interpreted in view of the elevated serum calcium^{3,4,5}.

Unlike C-terminal and midregion PTH, which typically are grossly elevated in subjects with renal insufficiency, intact PTH assays are less influenced by the declining renal function⁵.

PTH values are typically undetectable in hypocalcemia due to total hypoparathyroidism, but are found within the normal range in hypocalcemia due to partial loss or inhibition of parathyroid function.

4 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Intact PTH Immunoassay is a two-site ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] for the measurement of the biologically intact 84 amino acid chain of PTH. Two different goat polyclonal antibodies to human PTH have been purified by affinity chromatography to be specific for well-defined regions on the PTH molecule. One antibody is prepared to bind only the mid-region and C-terminal PTH 39-84 and this antibody is biotinylated. The other antibody is prepared to bind only the N-terminal PTH 1-34 and this antibody is labeled with horseradish peroxidase [HRP] for detection.

Streptavidin Well - Biotinylated Anti-PTH (39-84) --Intact PTH -- HRP conjugated Anti-PTH (1-34)
--

Although mid-region and C-terminal fragments are bound by the biotinylated anti-PTH (39-84), only the intact PTH 1-84 forms the sandwich complex necessary for detection. The capacity of the biotinylated antibody and the streptavidin coated microwell both have been adjusted to exhibit negligible interference by inactive fragments, even at very elevated levels.

In this assay, calibrators, controls, or patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled antibody and a biotin coupled antibody in a streptavidin-coated microplate well.

At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of intact PTH in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of intact PTH present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

5 KIT COMPONENTS

Kit Components	Description	Quantity
RGT 1 = Reagent 1	Biotinylated PTH Antibody	1 x 7.0 mL
RGT 2 = Reagent 2	Peroxidase (Enzyme) labeled PTH Antibody	1 x 7.0 mL
RGT B = Reagent B	TMB Substrate [tetramethylbenzidine]	1 x 20 mL
RGT 3 = Reagent 3	Diluent [equine serum] for Patient Samples read off-scale	1 x 2 mL
RGT A = Reagent A	ELISA Wash Concentrate [Saline with surfactant]	1 x 30 mL
SOLN = Stopping Solution	ELISA Stop Solution [1 N sulfuric acid]	1 x 20 mL
RGT 4 = Reagent 4	Reconstitution Solution containing surfactant	1 x 5 mL
PLA = Microplates	One holder with Streptavidin Coated Strips.	12 x 8-well strips
CAL = Calibrators A: 0 pg/mL B – F: Refer to vial labels for exact concentrations	Lyophilized synthetic h-PTH. Lyophilized Zero calibrator [BSA solution with goat serum]. All other calibrators consist of synthetic h-PTH (1-84) in BSA solution with goat serum.	1 x 0.5 mL per level
CTRL = Controls 1 & 2 Refer to vial labels for exact concentrations	Lyophilized. 2 Levels. Synthetic h-PTH (1-84) in BSA solution with goat serum.	1 x 0.5 mL per level

5.1 Material and Equipment required but not provided

- Microplate reader.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing may be acceptable].
- Precision Pipettors to deliver 25, 100 and 150 µL.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 50, 100 and 150 µL.
- Microplate Shakers: DRG has found for shaker diameters indicated below, the Streptavidin kits will maintain optimal performance response at the following speed settings:

Microplate Shakers	Shaking diameter	Speed setting
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 rpm
Linear	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 rpm

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

Although the reagents provided in this kit has been specifically designed to contain no human blood components, the human patient samples, which might be positive for HBsAg, HBeAg or HIV antibodies, must be treated as potentially infectious biohazard. Common precautions in handling should be exercised, as applied to any untested patient sample. Stopping Solution consists of 1 N Sulfuric Acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection, with appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.

If turbidity is observed in any reagent, do not perform assay and please contact your supplier.

Various types of shakers with different specifications are commercially available. In the event that the microplate shaker does not fall within the specified range above, each laboratory is encouraged to set their own optimal range.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The determination of Intact PTH should be performed with EDTA plasma or serum.

EDTA plasma has been reported to demonstrate improved PTH stability as compared to serum⁶.

To assay the specimen in duplicate, 50 µL of serum or EDTA plasma is required.

Collect whole blood without anticoagulant or lavender [EDTA] tube. After allowing blood to clot, the serum or plasma should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at –20 °C or lower.

Serum samples may be stored up to 8 hours at 2 °C - 8 °C.

Serum samples frozen at –20 °C are stable for up to 4 months.

8 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all kit components at 2 °C - 8 °C

1. All reagents except the calibrators, kit controls and the Wash Concentrate are ready-to-use. Store all reagents at 2 °C - 8 °C.
2. For each of the **calibrators** (Calibrator A through F) and **kit controls** 1 and 2, reconstitute each vial with 500 µL of Reagent 4 (Reconstitution Solution) and mix. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Use the calibrators and controls as soon as possible upon reconstitution. Freeze (-20°C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.** Standards and controls are stable at -20 °C for 6 weeks after reconstitution with up to 3 freeze thaw cycles when handled as recommended in "Procedural Notes" section.
3. Reagent A: **Wash Concentrate**; Mix contents of wash concentrate thoroughly. If precipitate is present in the Wash Concentrate due to storage at lower temperature such as 4 °C, dissolve by placing the vial in a 37 °C water bath or oven with swirling or stirring. Add wash concentrate (30 mL) to 570 mL of distilled or deionized water and mix. The diluted working wash solution is stable for 90 days when stored at room temperature.

9 ASSAY PROCEDURE

1. Place sufficient **Streptavidin Coated Strips** in a holder to run all six (6) PTH calibrators, A - F of the Intact PTH CALIBRATORS [Exact concentration is stated on the vial label], Quality Control Sera and patient samples. At a minimum, designate two wells to serve as "blanks". Refer to Step 9 for final plate reading.
2. Pipet **25 µL** of calibrators, controls, and samples into the designated or mapped well.
Freeze (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.
3. Add or dispense **50 µL** of Reagent 1 (Biotinylated Antibody) into each of the wells which already contain the calibrators, controls, and samples.
4. Add or dispense **50 µL** of Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) into each of the same wells. Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on a **shaker** set at recommended settings (see section 5.1) for **3 hours ± 30 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
5. First aspirate the fluid completely and then wash/aspirate each well five (5) times with the Working Wash Solution (prepared from Reagent A), using an automatic microplate washer. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
6. Add or dispense **150 µL** of the Reagent B (TMB Substrate) into each of the wells, except the blank wells.
7. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on a **shaker** set at recommended settings (see section 5.1) for **30 ± 5 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
8. Add or dispense **100 µL** of the Stopping Solution into each of the wells, except the blank wells. Mix gently.
9. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions by using the blank wells.*
Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**.
Read the plate **again** with the reader set to **405 nm** also against distilled or deionized water.

* If due to technical reasons the ELISA plate reader cannot be adjusted to zero using "blank," subtract the "blank," absorbance value from all other absorbance values to obtain results.

Note: The second reading is designed to extend the analytical validity of the calibration curve to the value represented by the highest calibrator, which is approximately 700 – 1,000 pg/mL. Hence, patient samples with PTH > 200 pg/mL can be quantified against a calibration curve consisting of the readings all the way up to the concentration equivalent to the highest calibrator using the 405 nm reading, away from the wavelength of maximum absorbance. In general, patient and control samples should be read using the 450 nm for PTH concentrations up to 200 pg/mL. PTH concentrations above 200 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.

10. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct a calibration curve via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of the intact PTH.

9.1 Procedural Notes

- Intact PTH 1-84 is a very labile molecule. Set up the assay immediately upon the reconstitution or the thawing of all calibrators, controls, and patient samples.
- It is recommended that all calibrators, controls, and patient samples are assayed in duplicate. The average absorbance units of duplicate sets should then be used for reduction of data and the calculation of results.
- The samples should be pipetted into the well with minimum amount of air-bubble. To achieve this, "reverse pipet" described in the package insert of the manufacturers of Pipettors is recommended.
- Patient samples with values greater than the highest calibrator (Calibrator F), which is approximately 700 - 1,000 pg/mL (see exact concentration on vial label), may be diluted with Reagent 3 (Sample Diluent) and reassayed. Multiply the result by the dilution factor.
- Reagents from different lot numbers must not be interchanged.
- If preferred, mix in equal volumes, in sufficient quantities for the assay, Reagent 1 (Biotinylated Antibody) and Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) in a clean amber bottle, then use 100 µL of the mixed antibody into each well. This alternative method should replace Step (3) and (4), to be followed with the incubation with orbital shaker.

10 CALCULATION OF RESULTS

Curve fitting Method:

Computer programs using cubic spline or 4 PL [4 Parameter Logistics] can generally give a good fit.

Important Note:

if the OD 450 nm of Calibrator A after blanking is ≥ 0.100 , the curve is invalid and no patient results should be reported.

Sample Data *at 450 nm* [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd 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	58.5	58.5
Patient Sample 3	2.375	2.454	2.415	> 200	*
Patient Sample 4	3.725	3.725	3.725	> 200	*

* Because the concentration readout is > 200 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 405 nm as shown in **Sample Data *at 405 nm*** in the table below.

Sample Data *at 405 nm* [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd 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	π
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	←

- ¶ For samples with readout < 200 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 450 nm as shown in **Sample Data at 450 nm** in the table above. This practice should give the results with optimum sensitivity of the assay.
- π Although the readout for Control (2) < 200 pg/mL, it is recommended that the actual result be read out and recorded for quality control evaluation purposes. Further, absorbance for Control 2 is sufficiently high to be analytically valid.
- ⇐ The absorbance readout is off-scale or higher than the average absorbance of the highest calibrator. Sample should be repeated with dilution.

NOTE: The data presented are for illustration purposes only and must not be used in place of data generated at the time of the assay.

11 QUALITY CONTROL

Control serum or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample should be considered invalid.

If the OD 450 nm of Calibrator A after blanking is ≥ 0.100 , the curve is invalid and no patient results should be reported.

12 LIMITATIONS OF PROCEDURE

The PTH (Parathyroid) Intact ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" with samples spiked with 2,100,000 pg/mL of Intact PTH.

Samples with intact PTH levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and reassayed for correct values.

Like any analyte used as a diagnostic adjunct, intact PTH results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests.

Because of the relationship between PTH and calcium in various disorders, PTH results should be interpreted in the context of serum calcium and the patient's clinical history.

The PTH (Parathyroid) Intact ELISA will detect non-Intact PTH (1-84) such as PTH fragment (7-84). PTH fragment (7-84) may cause falsely elevated Intact PTH results in patients with abnormal renal function because these patients may have various concentrations of PTH fragment (7-84) in their blood. In patients with abnormal renal function please interpret the Intact PTH results with caution and do not make patient management decisions on the Intact PTH result alone.

Supplements containing high biotin levels such as those marketed for hair, skin, and nail benefits, may contain interfering biotin amounts. Biotin levels higher than the recommended daily allowance may cause interference with the assay. Therefore, it is important to communicate with health care providers and patients about biotin intake when collecting samples to prevent incorrect test results. Results show that the highest concentration at which no significant interference was observed is 5 ng/mL of D-Biotin.

Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products may contain heterophilic antibodies that react with the reagent antibodies, potentially causing falsely elevated results. This assay has been formulated to mitigate the risk of this type of interference. However, potential interactions between patient sera and test components can occur.

13 EXPECTED VALUES

Intact PTH levels were measured in 148 apparently normal individuals in the U.S. with the PTH (Parathyroid) Intact ELISA.

The values obtained ranged from 9.0 to 94 pg/mL for serum.

Based on statistical tests on skewness and kurtosis, the population, when transformed logarithmically, follows the normal or Gaussian distribution.

The geometric mean + 2 standard deviations of the mean were calculated to be 10.4 to 66.5 pg/mL for serum.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Traceability

The DRG PTH intact calibrators are traceable to the WHO international standard PTH (1-84) recombinant NIBSC 95/646.

1.0 pg/mL = 1.07 pg/mL NIBSC 95/646

14.2 Accuracy

Three hundred and nine (309) patient samples, with intact PTH values ranging from 1.0 to 833 pg/mL were assayed by the previous DRG PTH kit and the updated DRG PTH kit. Linear regression analysis gives the following statistics:

DRG ELISA = 1.06 ELISA Kit - 1.49 pg/mL	r = 0.998	N = 309
---	-----------	---------

14.3 Sensitivity

The sensitivity, or minimum detection limit, of this assay is defined as the smallest single value, which can be distinguished from zero at the 95% confidence limit.

The PTH (Parathyroid) Intact ELISA has a calculated sensitivity of 1.57 pg/mL.

14.4 Specificity and Cross-Reactivity

The antibodies used in the PTH (Parathyroid) Intact ELISA were purified by affinity chromatography to be specific for well-defined regions on the PTH molecule. The peroxidase labeled antibody recognizes only the N-terminal region or the 1-34 amino acid sequence of the PTH molecule; whereas the biotinylated antibody is specific to the 39-84 segment. Accordingly, only intact PTH, which requires binding by both the enzyme conjugated and biotinylated antibodies, can be detected by this assay.

To further achieve the specificity of this assay, conjugation and biotinylation and the molar ratios thereof, have been optimized to minimize detection of fragments of PTH. Human PTH 1-34 at levels up to 300 pg/mL and the C-terminal 39-84 fragment at levels up to 300,000 pg/mL give molar cross-reactivities to PTH of less than 2% and 0.02%, respectively.

Human PTH 7-84 at level up to 1,000 pg/mL showed 44.5% cross-reactivity.

14.5 Precision and Reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the PTH (Parathyroid) Intact ELISA was calculated from 25 replicate determinations on each of the two samples.

Intra-Assay Variation

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

The total precision (inter-assay variation) of the PTH (Parathyroid) Intact ELISA was calculated from data on two samples obtained in 21 different assays, by three technicians on three different lots of reagents.

Inter-Assay Variation

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

14.6 Recovery

Various amounts of PTH 1-84 were added to three different patient sera to determine the recovery. The results are described in the following table:

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%

Average 103%

14.7 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism

Four patient serum samples were diluted with Reagent 3 (the Diluent for Patient Samples read off-scale).

Results in pg/mL are shown below:

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%

Average 95%

1 BESTIMMUNGSGEMÄSSE ANWENDUNG

Der PTH (Parathyroid) Intact ELISA dient der quantitativen Bestimmung von iPTH (intaktem Parathormon) in Humanserum.

Dieser Assay ist für die In-vitro-Diagnostik vorgesehen.

2 EINFÜHRUNG UND BESCHREIBUNG

PTH (Parathormon, Parathyrin, Parathyroidhormon) wird in den Nebenschilddrüsen als Präproparathormon, eine größere molekulare Hormonvorstufe, die aus 115 Aminosäuren besteht, biosynthetisiert. Das Präproparathormon wird nach einer sequenziellen intrazellulären Spaltung einer Sequenz von 25 Aminosäuren in die Hormonvorstufe Proparathormon, ein Polypeptid aus 90 Aminosäuren, umgewandelt. Durch weitere proteolytische Modifikationen wird das Proparathormon in Parathormon, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, umgewandelt. Bei gesunden Personen erfolgt die Regulierung der Parathormonsekretion durch eine negative Rückkopplungswirkung des Serumcalciums auf die Nebenschilddrüsen. Intaktes PTH ist biologisch aktiv und wird mit einer Halbwertszeit von weniger als vier Minuten [1] rasch aus dem Kreislauf eliminiert. PTH wird in den Nebenschilddrüsen, jedoch hauptsächlich peripher - insbesondere in der Leber, aber auch in den Nieren und Knochen - proteolytisch gespalten, wobei N-terminale sowie langlebigere C-terminale und mittig-regionale Fragmente entstehen. Personen mit Niereninsuffizienz weisen in PTH-Tests zur Feststellung von C-terminalen und mittregionalen Fragmenten typischerweise erhöhte Werte auf, wie sie auch mit einer verminderten renalen Clearance einhergehen[2].

3 KLINISCHE BEDEUTUNG

iPTH-Assays sind für die Abgrenzung des primären Hyperparathyreoidismus von anderen (nicht durch die Nebenschilddrüsen bedingten) Ursachen der Hyperkalzämie wie bösartige Gewebeveränderungen, Sarkoidose und Hyperthyreose von großer Bedeutung. Die Messung des Parathormons ist das spezifischste Verfahren zur Diagnose eines primären Hyperparathyreoidismus. Liegt eine Hyperkalzämie vor, kann bei einem gleichzeitig angehobenen Parathormonspiegel die Diagnose praktisch gestellt werden. Bei über 90% der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus ist die Konzentration des Parathormons erhöht[3].

Die häufigste sonstige Ursache einer Hyperkalzämie, eine maligne Grunderkrankung, geht mit supprimierten Konzentrationen des Parathormons[3] bzw. PTH-Konzentrationen innerhalb des Normbereichs einher[4]. Werden die Konzentrationen von iPTH und Serumcalcium zeichnerisch dargestellt, ist der bei Patienten mit einer durch Malignome bedingten Hyperkalzämie festgestellte iPTH-Spiegel fast immer unverhältnismäßig niedrig, wenn diese Werte im Zusammenhang mit den erhöhten Serumcalciumspiegeln interpretiert werden[3,4,5].

Im Gegensatz zu C-terminalen und mittregionalen Fragmenten, deren Werte bei Personen mit Niereninsuffizienz typischerweise extrem erhöht sind, zeigen iPTH-Assays eine weniger starke Beeinflussung durch die abnehmende Nierenfunktion[5].

PTH-Werte sind bei einer Hypokalzämie durch totalen Hypoparathyreoidismus typischerweise nicht nachweisbar. Sie liegen jedoch innerhalb des Normbereichs bei einer durch partiellen Verlust oder Hemmung der Nebenschilddrüsen-Funktion bedingten Hypokalzämie.

4 TESTPRINZIP

Der PTH (Parathyroid) Intact ELISA ist ein an zwei Stellen ansetzender ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] zur Messung des 84 Aminosäuren langen biologisch intakten Parathormons (PTH 1-84). Zwei verschiedene polyklonale Ziege-Antikörper gegen humanes PTH wurden affinitätschromatographisch gereinigt und sind für hinreichend definierte Regionen des PTH-Moleküls spezifisch. Ein Antikörper ist regionsspezifisch gegen die mittregionale und C-terminale Aminosäuresequenz 39-84. Dieser Antikörper ist biotinyliert.

Der andere Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen die N-terminale Aminosäuresequenz 1-34. Dieser Antikörper ist als Detektionsantikörper mit Meerrettich-Peroxidase [HRP] markiert.

Streptavidin beschichtetes Well - Biotinyliertes Anti-PTH (39-84) --Intakt PTH -- HRP gekoppeltes Anti-PTH (1-34)

Obwohl mittig-regionale und C-terminale Fragmente durch das biotinylierte anti-PTH 39-84 gebunden werden, bildet nur iPTH 1-84 den zum Nachweis erforderlichen Sandwich-Komplex. Die Kapazitäten der biotinylierten Antikörper und der mit Streptavidin beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden so angepasst, dass inaktive Fragmente das Ergebnis selbst bei höheren Konzentrationen nur in irrelevantem Maße beeinflussen.

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten. Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration an intaktem PTH in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren

ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die Konzentrationen an intaktem PTH in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt.

5 TESTKIT-KOMPONENTEN

Testkit-Komponenten	Bezeichnung	Menge
RGT 1 = Reagent 1	Biotinylierter PTH-Antikörper	1 x 7.0 mL
RGT 2 = Reagenz 2	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter PTH-Antikörper	1 x 7.0 mL
RGT B = Reagenz B	TMB-Substrat [Tetramethylbenzidin]	1 x 20 mL
RGT 3 = Reagenz 3	Verdünnungspuffer [Pferdeserum] für Patientenproben mit Werten außerhalb des Messbereichs	1 x 2 mL
RGT A = Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergenz]	1 x 30 mL
SOLN = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N Schwefelsäure]	1 x 20 mL
RGT 4 = Reagenz 4	Rekonstitutionslösung mit Detergenz	1 x 5 mL
PLA = Mikrotiterplatten	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen á 8 Vertiefungen
CAL = Kalibratoren A: 0 pg/mL B – F: Genaue Konzentrationen auf Flaschenetiketten	Lyophilisiertes synthetisches h-PTH. Lyophilisierter Nullkalibrator [BSA/Ziegenserum-Lösung]. Alle anderen Kalibratoren enthalten synthetisches h-PTH 1-84 in BSA/Ziegenserum-Lösung].	1 x 0.5 mL je Level
CTRL = Kontrollen 1 & 2 Genaue Bereiche auf Flaschenetiketten	Lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h-PTH 1-84 in BSA/Ziegenserum-Lösung].	1 x 0.5 mL je Level

5.1 Weitere erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltenen Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Lesegerät
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25, 100 und 150 µL
- (Optional): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 50, 100 und 150 µL
- Mikrotiterplattenschüttler: DRG hat die folgenden Drehzahleinstellungen für die einzelnen Schütteldurchmesser ermittelt, bei denen die Streptavidin-Kits ihre optimale Leistungsreaktion behalten:

Mikrotiterplattenschüttler	Schütteldurchmesser	Drehzahleinstellung
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 U/min
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 U/min
Linear	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 U/min

6 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieses Testkits sind spezifisch so beschaffen, dass sie keine humanen Blutkomponenten enthalten. In den humanen Patientenproben kann das Vorhandensein von HBsAg, HBcAg bzw. HIV-Antikörpern jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Die bei ungetesteten Patientenproben üblichen Vorsichtsmaßnahmen gelten auch für den Umgang mit diesem Material.

Die Stopplösung besteht aus 1 N Schwefelsäure. Dies ist eine starke Säure. Obwohl sie verdünnt ist, ist sie mit Sorgfalt zu handhaben. Sie kann Verätzungen verursachen. Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Schutzkleidung sind zu tragen. Verschüttete Säure ist vor dem Aufwischen mit großen Mengen Wasser zu verdünnen. Dämpfe nicht einatmen.

Wenn eine Trübung in einem Reagenz beobachtet wird, führen Sie keinen Assay durch und kontaktieren Sie Ihren Lieferanten.

Im Handel sind verschiedene Schüttlertypen mit unterschiedlichen technischen Daten erhältlich. Falls der im Labor eingesetzte Mikrotiterplattenschüttler andere als die oben angegebenen Daten aufweist, sollten Sie selbst die optimale Einstellung ermitteln.

7 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung von intaktem PTH sollte mit EDTA-Plasma oder Serum erfolgen. Es wurde festgestellt, dass PTH in EDTA-Plasma erheblich stabiler als in Serum ist[6]. Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, werden 50 µL Serum oder EDTA-Plasma benötigt. Vollblut in einem Reagenzglas ohne Antikoagulanzen bzw. violetten Stopfen [EDTA] sammeln.

Nach Gerinnung des Bluts sind Serum bzw. Plasma sofort zu trennen, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, und bei -20 °C oder kälter zu lagern.

Serumproben können bei 2 °C - 8 °C bis zu 8 Stunden gelagert werden. Auf -20 °C tiefgefrorene Serumproben sind bis zu 4 Monate stabil.

8 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Alle Testkit-Komponenten bei 2 °C - 8 °C lagern.

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. Jeden der Kalibratoren (Kalibrator A bis F) und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 500 µL des Reagenz 4 (Rekonstitutionslösung) rekonstituieren und mischen. Flasche 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -20 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.
3. Reagenz A:
Waschkonzentrat: Inhalt gründlich mischen. Ist eine Präzipitatbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist das Präzipitat durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad oder einem Inkubator bei 37 °C und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 mL) zu 570 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

9 TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) PTH-Kalibratoren, A – F der Intakt-PTH-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Qualitätskontrollseren und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen.
Lassen Sie mindestens 2 Vertiefungen für den Leerwert (Blank) frei. Siehe Schritt #9 dieses Kapitels.
2. **25 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen bzw. gekennzeichneten Vertiefungen pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).**
3. **50 µL** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
4. **50 µL** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten.
Platte **3 Stunden** ± 30 Minuten bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) **auf einem Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt 5.1).
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen, anschließend jede der Vertiefungen 5-mal mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf 0,35 mL je Vertiefung einzustellen.
6. **150 µL** des Reagenz B (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren, außer in die Vertiefungen, die für den Leerwert vorgesehen sind.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt 5.1).
8. **100 µL** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren, außer in die Vertiefungen, die für den Leerwert vorgesehen sind. Vorsichtig mischen.
9. Vor Beginn der Messung sicherstellen, dass die beiden für den Leerwert vorgesehenen Vertiefungen (siehe Schritt # 1), mit 250 µL destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllt sind.
Nach Anleitung des Herstellers und unter Verwendung der Leerwert-Vertiefungen einen Nullabgleich des Mikrotiterplatten-Lesegerätes durchführen.*
Innerhalb von 10 Minuten die Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmen.
Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen.
* Falls es aus technischen Gründen nicht möglich ist, einen Nullabgleich des Mikrotiterplatten-Lesegerätes durchzuführen, subtrahieren Sie den Absorptionswert des Leerwertes jeweils von allen anderen Absorptionswerten, um die Ergebnisse zu erhalten.

Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 700 – 1 000 pg/mL) auszudehnen. Somit können Patientenproben mit PTH > 200 pg/mL gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Im Allgemeinen sind Patienten- und Kontrollproben bei PTH-Konzentrationen von bis zu 200 pg/mL bei 450 nm abzulesen. PTH-Konzentrationen oberhalb von 200 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.
10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte kann eine Kalibrationskurve mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der intakten PTH-Konzentration erstellt werden.

9.1 Verfahrenstechnische Hinweise

- Intaktes PTH 1-84 ist ein sehr instabiles Molekül. Sofort nach Rekonstitution bzw. Auftauen sämtlicher Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit dem Test beginnen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen. Für die Datenreduktion und die Berechnung der Ergebnisse sind dann die mittleren Absorptionseinheiten der doppelbestimmten Reihen zu verwenden.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden. Dies wird durch Umkehren des Pipettiervorgangs erreicht, wie in der Pipetten-Packungsbeilage beschrieben.
- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F), ca. 700 - 1 000 pg/mL (genaue Konzentrationsangabe auf dem Flaschenetikett), sind mit Reagenz 3 (Probenverdünnungspuffer) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Nur Reagenzien einer Charge verwenden.
- Alternativ können für den Test ausreichende Mengen Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) und Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) zu gleichen Teilen in einer sauberen brauntransparenten Flasche gemischt werden. Anschließend 100 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4). Darauf folgt die Inkubation im Orbitalschüttler.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Methode der Kurvenanpassung:

Computerprogramme, die mit kubischen Splines oder 4 PL [4-Parameter Logistik] arbeiten, liefern erfahrungsgemäß gute Ergebnisse.

Wichtiger Hinweis:

Wenn sich für Kalibrator A (OD 450 nm) nach der Leerwerteinstellung ein Wert von $\geq 0,100$ ergibt, ist die Kurve ungültig und es dürfen die Patientenergebnisse nicht protokolliert werden.

Beispieldaten bei 450 nm [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser

	1. Messung Absorptions- einheit	2. Messung Absorptions- einheit	Mittelwert Absorptions- einheit	Intaktes PTH pg/mL	Intaktes PTH pg/mL – Anzugebened Ergebnis
Kalibrator A	0.020	0.016	0.018		0
Kalibrator B	0.056	0.051	0.054		7
Kalibrator C	0.124	0.119	0.122		18
Kalibrator D	0.388	0.393	0.391		55
Kalibrator E	1.335	1.340	1.338		210
Kontrolle 1	0.200	0.200	0.200	27.6	27.6
Kontrolle 2	0.804	0.794	0.799	119	119
Patientenprobe1	0.147	0.136	0.142	19.1	19.1
Patientenprobe2	0.407	0.409	0.408	58.5	58.5
Patientenprobe3	2.375	2.454	2.415	> 200	*
Patientenprobe4	3.725	3.725	3.725	> 200	*

* Da die gemessene Konzentration > 200 pg/mL ist, sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten bei 405 nm** aufgeführt sind.

Beispieldaten bei 405 nm [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

	1. Messung Absorptionseinheit	2. Messung Absorptionseinheit	Mittelwert Absorptionseinheit	Intaktes PTH pg/mL	Intaktes PTH pg/mL –Anzugegebenes Ergebnis
Kalibrator A	0.014	0.008	0.011		0
Kalibrator D	0.124	0.128	0.126		55
Kalibrator E	0.428	0.425	0.427		210
Kalibrator F	1.309	1.317	1.313		700
Kontrolle 1	0.074	0.066	0.070	< 200	¶
Kontrolle 2	0.260	0.251	0.256	121	π
Patientenprobe1	0.049	0.043	0.046	< 200	¶
Patientenprobe2	0.132	0.133	0.133	< 200	¶
Patientenprobe3	0.758	0.782	0.770	401	401
Patientenprobe4	1.314	1.321	1.318	> 700	←

- ¶ Für Proben mit einem Messwert < 200 pg/mL sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, wie sie oben in der Tabelle **Beispieldaten** bei 450 nm aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.
- π Obwohl der Messwert für Kontrolle (2) < 200 pg/mL ist, wird empfohlen, das tatsächliche Ergebnis zu übernehmen und für eine Auswertung in der Qualitätskontrolle aufzuzeichnen. Darüber hinaus ist die Absorption für Kontrolle (2) ausreichend hoch, um für die Analyse von Bedeutung zu sein.
- ← Der Absorptionswert liegt außerhalb des Messbereichs oder ist höher als die mittlere Absorption des höchsten Kalibrators. Die Probe ist zu verdünnen und erneut zu testen.

HINWEIS: Die verwendeten Daten dienen lediglich zur Illustration. Sie sind nicht anstelle der während der Testdurchführung ermittelten Daten zu verwenden.

11 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollseren oder Serumpools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mithilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Liegen bei einem Test einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Wenn sich für Kalibrator A (OD 450 nm) nach der Leerwerteinstellung ein Wert von $\geq 0,100$ ergibt, ist die Kurve ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht protokolliert werden.

12 GRENZEN DES VERFAHRENS

Der PTH (Parathyroid) Intact ELISAkit zeigt keinen „High-dose-hook-Effekt“ bei Proben, die mit 2.100.000 pg/mL intaktem PTH versetzt sind. Proben mit intakten PTH-Konzentrationen höher als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind intakte PTH-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren.

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen PTH und Kalzium bei verschiedenen Erkrankungen müssen PTH-Ergebnisse im Kontext von Serumkalzium und der Krankengeschichte des Patienten interpretiert werden.

Der PTH (Parathyroid) Intact ELISA erkennt Non-Intakt-PTH (1-84) wie z. B. das PTH-Fragment (7-84). PTH-Fragment (7-84) kann zu fälschlicherweise erhöhten Intakt-PTH-Ergebnissen bei Patienten mit abnormaler Nierenfunktion führen, da diese Patienten unterschiedliche Konzentrationen von PTH-Fragment (7-84) im Blut haben können.

Bei Patienten mit abnormaler Nierenfunktion die Intakt-PTH-Ergebnisse mit Vorsicht interpretieren und Entscheidungen zur Patientenbehandlung nicht alleinig auf das Intakt-PTH-Ergebnis stützen.

Durch die Einnahme von Biotin-Nahrungsergänzungsmitteln, die das Erscheinungsbild von Haaren, Haut und Nägeln verbessern sollen, können die Ergebnisse des Assays beeinflusst werden, wenn die empfohlene Biotin-Tagesdosis überschritten wird. Daher müssen bei der Entnahme von Proben Gesundheitsdienstleister und Patienten hinsichtlich der Einnahme von Biotin befragt werden, um falsche Untersuchungsergebnisse zu vermeiden. Die Ergebnisse zeigen, dass die höchste Konzentration, bei der keine signifikante Interferenz beobachtet wurde, bei 5 ng/mL D-Biotin liegt.

Proben von Patienten, die regelmäßig Tieren oder Tierserumprodukten ausgesetzt sind, können heterophile Antikörper enthalten, welche mit dem Antikörperreagenz reagieren, was zu fälschlicherweise erhöhten Ergebnissen führen kann. Dieser Assay wurde so formuliert, dass das Risiko einer solchen Art der Ergebnisbeeinflussung abgeschwächt ist. Dennoch können Wechselwirkungen zwischen Patientenserum und Testkomponenten auftreten.

13 ERWARTETE WERTE

Mithilfe des PTH (Parathyroid) Intact ELISA wurden in den USA bei 148 scheinbar gesunden Probanden intakte PTH-Konzentrationen gemessen.

Die ermittelten Werte lagen in einem Bereich von 9,0 bis 94 pg/mL für Serum.

Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzessverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung.

Das geometrische Mittel + 2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab einen Bereich von 10,4 bis 66,5 pg/mL für Serum.

14 LEISTUNGSMERKMALE**14.1 Rückverfolgbarkeit**

Die DRG PTH intact-Kalibratoren sind gemäß der internationalen WHO-Norm NIBSC 95/646 für rekombinantes PTH (1-84) rückverfolgbar.

1,0 pg/mL = 1,07 pg/mL NIBSC 95/646

14.2 Genauigkeit

Dreihundertneun (309) Patientenproben mit PTH-intakten-Werten zwischen 1,0 und 833 pg/mL wurden mit dem vorherigen PTH (Parathyroid) Intact ELISA und dem aktualisierten PTH (Parathyroid) Intact ELISA getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

DRG ELISA = 1,06 ELISA Kit - 1,49 pg/mL	r = 0,998	N = 309
---	-----------	---------

14.3 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze ist bei diesem Test als der kleinste Einzelwert definiert, der bei einer Vertrauensgrenze von 95 % von Null unterschieden werden kann.

Der PTH (Parathyroid) Intact ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,57 pg/mL.

14.4 Spezifität und Kreuzreaktivität

Die im PTH (Parathyroid) Intact ELISA verwendeten Antikörper wurden affinitätschromatographisch gereinigt und sind für hinreichend definierte Regionen des PTH-Moleküls spezifisch. Der mit Peroxidase markierte Antikörper erkennt nur die N-terminale Region bzw. die Aminosäuresequenz 1-34 des PTH-Moleküls, während der biotinylierte Antikörper für die Sequenz 39-84 spezifisch ist. Entsprechend kann nur intaktes PTH, welches eine Bindung sowohl durch den enzymgekoppelten als auch den biotinylierten Antikörper erfordert, in diesem Test nachgewiesen werden.

Um die Spezifität des Tests zu gewährleisten, wurden Enzymkoppelung und Biotinylierung sowie deren molare Verhältnisse optimiert, um den Nachweis von PTH-Fragmenten zu minimieren. Humanes PTH 1-34 in Konzentrationen bis zu 300 pg/mL und C-terminale Fragmente 39-84 in Konzentrationen bis zu 300 000 pg/mL ergeben jeweils eine molare Kreuzreaktivität gegenüber PTH von weniger als 2 % bzw. 0,02 %.

Humanes PTH 7-84 in einer Konzentration bis 1.000 pg/mL wies eine Kreuzreaktivität von 44,5 % auf.

14.5 Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision (Intra-Assay-Abweichung) des PTH (Parathyroid) Intact ELISA wurde durch 25 wiederholte Messungen jeder der beiden Proben ermittelt.

Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	32,4	25	6,08
B	178,2	25	3,68

Die Gesamtpräzision (Inter-Assay-Abweichung) des PTH (Parathyroid) Intact ELISA wurde durch die Bestimmung von zwei Proben in 21 Testansätzen ermittelt. Die Tests wurden von drei Labortechnikern unter Verwendung von Reagenzien aus drei verschiedenen Chargen durchgeführt.

Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	30,3	21	3,6
B	159,1	21	2,8

14.6 Wiederfindung

Drei verschiedene Patientenserumproben wurden zur Bestimmung der Wiederfindung mit unterschiedlichen Mengen PTH 1-84 versetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Serumprobe	Endogenes PTH (pg/mL)	Zugesetztes PTH (pg/mL)	Erwarteter Wert (pg/mL)	Gemessener Wert (pg/mL)	Wiederfindung (%)
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%

Mittelwert 103 %

14.7 Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität

Vier Patientenserumproben wurden mit Reagenz 3 (Verdünnungspuffer für Patientenproben mit Werten außerhalb des Messbereichs) verdünnt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in pg/mL dargestellt:

Probe	Verdünnung	Erwartet	Beobachtet	% Beobachtet ÷ Erwartet
A	Unverdünnt	-	322	-
	1:2	161	148	92%
	1:4	80,5	73,1	91%
	1:8	40,3	41,5	103%
B	Unverdünnt	-	230	-
	1:2	115	97	84%
	1:4	58	55	95%
	1:8	29	30	103%
C	Unverdünnt	-	176	-
	1:2	88	82	93%
	1:4	44	45	102%
	1:8	22	24	109%
D	Unverdünnt	-	426	-
	1:2	213	192	90%
	1:4	107	90	84%
	1:8	53	47	89%

Mittelwert 95 %

Test PTH intatto [ormone paratiroideo] ELISA [saggio immunoenzimatico]

Analisi quantitativa specifica per la determinazione dell'ormone paratiroideo intatto nel siero

1 USO PREVISTO

Il test PTH (Parathyroid) Intact ELISA è volto alla determinazione quantitativa di PTH intatto (ormone paratiroideo) nel siero umano.

Questo tipo di analisi è destinato all'impiego diagnostico in vitro.

2 RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

Il PTH (ormone paratiroideo, paratormone, paratirina) è sintetizzato nella ghiandola paratiroide come ormone prepro-PTH, un precursore molecolare più grande, costituito da 115 aminoacidi. In seguito alla proteolisi intracellulare di una sequenza di 25 aminoacidi, l'ormone prepro-PTH è trasformato in un ormone pro-PTH polipeptidico intermedio, costituito da 90 aminoacidi. Un'ulteriore regolazione proteolitica determina la trasformazione dell'ormone pro-PTH nell'ormone paratiroideo, un polipeptide di 84 aminoacidi. Negli individui sani, la regolazione della secrezione dell'ormone paratiroideo avviene normalmente mediante un'azione a feedback negativo del calcio sierico nelle ghiandole paratiroidi. Il PTH intatto è biologicamente attivo e viene rapidamente rimosso dalla circolazione con un'emivita inferiore ai quattro minuti¹. Il PTH è soggetto a proteolisi nelle ghiandole paratiroidi, ma soprattutto a livello periferico, in particolare nel fegato, ma anche nei reni e nelle ossa, per produrre frammenti N-terminali e frammenti di maggiore durata C-terminali e della regione medio molecolare. In individui affetti da insufficienza renale, le analisi PTH C-terminali e della regione medio molecolare generalmente forniscono risultati PTH elevati, come indicato da una clearance renale compromessa².

3 SIGNIFICATO CLINICO

I test PTH intatto sono importanti per differenziare l'iperparatiroidismo primario da altre forme di ipercalcemia (senza mediazione paratiroidea), quali neoplasie, sarcoidosi e tireotossicosi². La misurazione dell'ormone paratiroideo è il metodo più specifico per formulare la diagnosi di iperparatiroidismo primario. In presenza di ipercalcemia, un livello elevato dell'ormone paratiroideo stabilisce di fatto la diagnosi. L'ormone paratiroideo risulterà elevato³ in una percentuale superiore al 90% dei pazienti affetti da iperparatiroidismo primario.

L'altra causa più comune di ipercalcemia, ossia ipercalcemia maligna, è associata a bassi livelli dell'ormone paratiroideo³ oppure a livelli PTH compresi nei limiti normali⁴. Quando il livello di PTH intatto viene raffrontato con il calcio sierico, per i pazienti con ipercalcemia maligna si rileva quasi sempre una concentrazione di PTH intatto eccessivamente bassa, se l'interpretazione avviene alla luce di valori elevati di calcio sierico^{3,4,5}.

Diversamente dal PTH C-terminale e della regione medio molecolare, dai valori generalmente molto elevati nei soggetti con insufficienza renale, i test per il PTH intatto sono influenzati in misura minore da una funzione renale ridotta⁵.

In genere nell'ipocalcemia i valori PTH non sono rilevabili a causa dell'ipoparatiroidismo totale, tuttavia sono identificabili nella normalità come conseguenza della parziale perdita o dell'inibizione della funzione paratiroidea.

4 PRINCIPIO DEL TEST

Il saggio immunoenzimatico PTH intatto DRG è un test ELISA (saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato) a doppio anticorpo per la misurazione della catena di 84 aminoacidi biologicamente intatta del PTH. Due diversi anticorpi policlonali di capra anti-PTH umano sono stati purificati mediante cromatografia per affinità al fine di ottenere una specificità per regioni ben definite della molecola PTH. Un anticorpo biotilinato è preparato per legarsi solo al PTH 39-84 della regione medio molecolare e C-terminale.

L'altro anticorpo è preparato per legarsi solo al PTH 1-34 del frammento N-terminale ed è marcato con perossidasi di rafano [HRP].

Pozzetto rivestito di streptavidina - Anti-PTH biotilinato (39-84) - PTH intatto - Anti-PTH coniugato HRP (1-34)

Benché i frammenti della regione medio molecolare e C-terminali siano legati dall'anticorpo anti-PTH biotilinato (29-84), soltanto il PTH intatto 1-84 forma il complesso sandwich necessario per rilevare l'anticorpo. Le capacità dell'anticorpo biotilinato e del micropozzetto rivestito di streptavidina sono state regolate per mostrare un'interferenza trascurabile dei frammenti inattivi, anche a livelli estremamente elevati.

In questo saggio, i calibratori, i controlli o i campioni paziente vengono incubati contemporaneamente con un anticorpo marcato con enzima e con uno coniugato con biotina in un pozzetto per micropiastra rivestita di streptavidina. Al termine dell'incubazione del saggio, il micropozzetto viene lavato per eliminare i residui non legati e l'enzima legato alla fase solida viene incubato con il substrato (tetrametilbenzidina, TMB). In seguito per arrestare la reazione viene aggiunta una soluzione bloccante acida, che conferisce al liquido una colorazione gialla. L'intensità cromatica è direttamente proporzionale alla concentrazione di PTH intatto nel campione. Sulla base dei risultati ottenuti dai calibratori viene generata una curva di risposta alla dose di unità di assorbanza in relazione alla concentrazione. Le concentrazioni di PTH intatto presenti nei controlli e nei campioni paziente sono determinate direttamente da questa curva.

5 COMPONENTI DEL KIT

Componenti del kit	Descrizione	Quantità
RGT 1 = Reagente 1	Anticorpo PTH biotilinato	1 x 7.0 mL
RGT 2 = Reagente 2	Anticorpo PTH marcato con perossidasi (enzima)	1 x 7.0 mL
RGT B = Reagente B	Substrato TMB [tetrametilbenzidina]	1 x 20 mL
RGT 3 = Reagente 3	Diluente [siero equino] per scala di lettura dei campioni paziente	1 x 2 mL
RGT A = Reagente A	Soluzione di lavaggio concentrate ELISA (fisiologica con tensioattivi)	1 x 30 mL
SOLN = Soluzione bloccante	Soluzione bloccante ELISA [1 N acido solforico]	1 x 20 mL
RGT 4 = Reagente 4	Soluzione di ricostituzione contenente tensioattivi	1 x 5 mL
PLA = Micropiastre	Contenitore con strisce rivestite di streptavidina	12 strisce Per 8 pozzetti
CAL = Calibratori A: 0 pg/mL B – F: Le concentrazioni esatte sono riportate sull'etichetta delle provette	h-PTH sintetico liofilizzato. Calibratore zero liofilizzato [soluzione BSA con siero di capra]. Tutti gli altri calibratori sono composti da h-PTH sintetico (1-84) in soluzione BSA con siero di capra	1 x 0,5 mL per livello
CTRL = Controlli 1 e 2 I valori esatti sono riportati sull'etichetta delle provette	Liofilizzati. 2 livelli. h-PTH sintetico (1-84) in soluzione BSA con siero di capra	1 x 0,5 mL per livello

5.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONE NECESSARI (NON IN DOTAZIONE)

- Lettore per micropiastre.
- Lavatore per micropiastre (il lavaggio manuale è consentito in assenza di un lavatore automatico).
- Pipette di precisione per 25, 100 e 150 µL.
- *Opzionale:* distributore multicanale o a ripetizione per 50, 100 e 150 µL.
- Agitatori per micropiastre: DRG ha rilevato che, con gli agitatori di diametro sotto indicato, i kit di streptavidina manterranno una risposta ottimale alle seguenti impostazioni di velocità:

Agitatori per micropiastre	Diametro di agitazione	Impostazione di velocità
Orbitale	3 mm (0,1118 in)	600 ± 10 giri/minuto
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 giri/minuto
Lineare	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 giri/minuto

6 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Benché i reagenti forniti nel presente kit siano stati studiati in modo da non contenere componenti ematiche umane, i campioni di pazienti che potrebbero risultare positivi agli anticorpi HBsAg, HBcAg o HIV devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente infettivo. Osservare le precauzioni standard nella manipolazione dei campioni, analogamente a quanto previsto per i campioni di pazienti non analizzati.

La soluzione bloccante è un composto di 1 N acido solforico, un forte acido che, anche se diluito, va trattato con grande cautela, poiché può provocare ustioni. Indossare un paio di guanti, occhiali e indumenti protettivi. Lavare immediatamente eventuali versamenti con abbondanti quantità di acqua. Non respirare i vapori ed evitare di inalarli.

Se un reagente appare torbido, non eseguire il test e contattare il fornitore.

Sono disponibili in commercio vari tipi di agitatori con specifiche diverse. Qualora l'agitatore per micropiastre non rientri nell'intervallo sopra specificato, il laboratorio dovrà definire il proprio intervallo ottimale.

7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione del PTH intatto deve essere effettuata con plasma o siero EDTA. È stato documentato che il plasma EDTA dimostra una migliore stabilità del PTH rispetto al siero⁶. Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 50 µL di siero o di plasma EDTA. Raccogliere il sangue intero in una provetta senza anticoagulante o lavanda [EDTA]. Lasciare coagulare il sangue, quindi separare tempestivamente il siero o il plasma, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare a una temperatura pari o inferiore a -20 °C.

I campioni di siero devono essere conservati a 2 °C - 8 °C per un massimo di 8 ore. I campioni congelati a -20 °C sono stabili per un massimo di 4 mesi.

8 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

Conservare tutti i componenti del kit a 2 °C - 8 °C.

1. Tutti i reagenti, tranne i calibratori, i controlli e la soluzione di lavaggio concentrata, sono pronti per l'uso. Conservare tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C..
2. Per ogni calibratore (calibratore A - F) ed i controlli 1 e 2, ricostituire ciascuna provetta con 500 µL di reagente 4 (soluzione di ricostituzione) e mescolare. Incubare la provetta per 10 minuti, quindi mescolare abbondantemente agitando delicatamente per inversione per completare la ricostituzione. **Dopo la ricostituzione, usare calibratori e controlli quanto prima. Dopo l'uso, congelare (-20 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.** I campioni standard e di controllo sono stabili a -20 °C per 6 settimane dopo la ricostituzione, con un massimo di 3 cicli di congelamento-scongelo, se trattati in base alle raccomandazioni riportate nella sezione "Note sulla procedura".
3. Reagente A:
Soluzione di lavaggio concentrata: mescolare abbondantemente il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata. In presenza di un precipitato nella soluzione di lavaggio concentrata, dovuto a conservazione a basse temperature (es. 4 °C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in un forno a 37 °C con agitatore. Aggiungere la soluzione di lavaggio concentrata (30 mL) a 570 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 90 giorni se conservata a temperatura ambiente.

9 PROCEDURA DI ANALISI

1. Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori PTH, A ~ F tra i CALIBRATORI di PTH intatto (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), sieri di controllo qualità e campioni paziente. Predisporre minimo due pozzetti come "bianchi". Consultare il passaggio 9 per la lettura finale della piastra.
2. Pipettare **25 µL** di calibratori, controlli e campioni nel pozzetto previsto.
Dopo l'uso, congelare (-20 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.
3. Aggiungere o versare **50 µL** di reagente 1 (anticorpo biotilinato) in ciascun pozzetto contenente i calibratori, controlli e campioni.
4. Aggiungere o versare **50 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti. Coprire le micropiastre con una pellicola di alluminio o con una vaschetta per ripararle dalla luce. Posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione 5.1) per 170 ± 10 giri/minuto per **3 ore ± 30 minuti** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
5. Aspirare completamente il liquido, quindi lavare/aspirare ogni pozzetto cinque (5) volte con la soluzione di lavaggio (preparata dal reagente A), mediante un lavatore automatico per micropiastre. Impostare il volume della soluzione di lavaggio in modo che in ciascun pozzetto vengano versati 0,35 mL.
6. Aggiungere o versare **150 µL** di reagente B (substrato TMB) in ogni pozzetto, tranne nei pozzetti bianchi.
7. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione 5.1) per **30 ± 5 minuti** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
8. Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto, tranne nei pozzetti bianchi. Mescolare delicatamente.
9. Prima della lettura, accertarsi che entrambi i "pozzetti bianchi" citati al passaggio 1 siano stati riempiti con 250 µL di acqua distillata o deionizzata.
Azzerare il lettore secondo le istruzioni del produttore utilizzando i pozzetti bianchi. *Leggere l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore per micropiastre impostato su **450 nm**.
Leggere nuovamente la piastra con il lettore impostato a **405 nm** anche contro acqua distillata o deionizzata.

**Se, per motivi tecnici, il lettore ELISA non può essere regolato a zero utilizzando un pozzetto "bianco", per ottenere i risultati sottrarre il valore di assorbanza "bianco" da tutti gli altri valori di assorbanza.*

Nota: la seconda lettura serve ad ampliare la validità analitica della curva di calibrazione al valore rappresentato dal calibratore con il livello massimo, pari a circa 700 - 1000 pg/mL. Pertanto i campioni paziente con un livello PTH > 200 pg/mL possono essere quantificati in relazione ad una curva di calibrazione, costituita dai valori compresi sino all'equivalente di concentrazione del calibratore più elevato, usando il valore 405 nm, lontano dalla lunghezza d'onda della massima assorbanza. In generale, i campioni paziente e di controllo dovrebbero essere letti usando il valore 450 nm per concentrazioni di PTH sino a 200 pg/mL. Concentrazioni di PTH superiori a 200 pg/mL devono essere interpolate con il valore 405 nm.

10. Utilizzando i valori di assorbanza finali ottenuti nella fase precedente, costruire una curva di calibrazione mediante interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto per quantificare la concentrazione di PTH intatto.

9.1 NOTE SULLA PROCEDURA

- Il PTH intatto 1-84 è una molecola molto instabile. Preparare quindi il saggio immediatamente dopo la ricostituzione o lo scongelamento di tutti i calibratori, controlli e campioni paziente.
- Si raccomanda di analizzare tutti i calibratori, controlli e campioni paziente in duplicato. Le unità di assorbanza media dei duplicati devono essere impiegate per la riduzione di dati e per il calcolo dei risultati.
- I campioni devono essere pipettati nel pozzetto con la minima quantità possibile di bolle d'aria. A tale fine, si raccomanda di eseguire il "pipettaggio inverso" descritto nelle istruzioni del produttore delle pipette.
- I campioni paziente con valori superiori al calibratore più elevato (calibratore F), pari a circa 700 - 1000 pg/mL (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), possono essere diluiti con il reagente 3 (diluente per campione) e rianalizzati. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.
- I reagenti con numeri di partita diversi non devono essere scambiati.
- Eventualmente mescolare, in volumi uguali e in quantità sufficienti per l'analisi, il reagente 1 (anticorpo biotilinato) e il reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) in un flacone pulito color ambra. Quindi distribuire 100 µL dell'anticorpo mescolato in ciascun pozzetto. Questo metodo alternativo sostituisce i passaggi (3) e (4) e va seguito dall'incubazione con agitatore orbitale.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

Metodo di interpolazione della curva:

i programmi che utilizzano l'interpolazione a spline cubica o a 4 parametri logistici offrono generalmente un buon adattamento.

Nota importante:

se la densità ottica (OD 450 nm) del calibratore A dopo l'azzeramento è $\geq 0,100$, la curva non sarà valida e pertanto i risultati del paziente dovranno essere esclusi.

Dati campione a 450 nm (lettura unità di assorbanza grezze contro acqua distillata o deionizzata)

Pozzetto micropiastra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	PTH intatto pg/mL	PTH intatto pg/mL – Risultato
Calibratore A	0,020	0,016	0,018		0
Calibratore B	0,056	0,051	0,054		7
Calibratore C	0,124	0,119	0,122		18
Calibratore D	0,388	0,393	0,391		55
Calibratore E	1,335	1,340	1,338		210
Controllo 1	0,200	0,200	0,200	27,6	27,6
Controllo 2	0,804	0,794	0,799	119	119
Campione paziente 1	0,147	0,136	0,142	19,1	19,1
Campione paziente 2	0,407	0,409	0,408	58,5	58,5
Campione paziente 3	2,375	2,454	2,415	> 200	*
Campione paziente 4	3,725	3,725	3,725	> 200	*

* Poiché il valore della concentrazione è > 200 pg/mL, si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 405 nm come indicato nei **Dati campione** a 405 nm nella tabella seguente.

Dati campione a 405 nm (lettura unità di assorbanza grezze contro acqua distillata o deionizzata)

Pozzetto micropiastra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	PTH intatto pg/mL	PTH intatto pg/mL – Risultato
Calibratore A	0,014	0,008	0,011		0
Calibratore D	0,124	0,128	0,126		55
Calibratore E	0,428	0,425	0,427		210
Calibratore F	1,309	1,317	1,313		700
Controllo 1	0,074	0,066	0,070	< 200	¶
Controllo 2	0,260	0,251	0,256	121	π
Campione paziente 1	0,049	0,043	0,046	< 200	¶
Campione paziente 2	0,132	0,133	0,133	< 200	¶
Campione paziente 3	0,758	0,782	0,770	401	401
Campione paziente 4	1,314	1,321	1,318	> 700	←

¶ Per i campioni con un valore > 200 pg/mL, si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 450 nm come indicato nei Dati campione a 450 nm nella prima tabella. Questo metodo fornisce risultati che garantiscono la sensibilità ottimale del saggio.

π Nonostante il valore del controllo (2) sia < 200 pg/mL, si raccomanda di leggere e registrare l'effettivo valore ai fini della valutazione del controllo qualità. Inoltre l'assorbanza del controllo 2 è sufficientemente elevata da risultare valida dal punto di vista analitico.

← Il valore di assorbanza è fuori scala o superiore all'assorbanza media del calibratore più elevato. Ripetere il campione diluendolo.

NOTA:

i dati presentati sono forniti esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere utilizzati in sostituzione dei dati generati al momento dell'analisi.

11 CONTROLLO QUALITÀ

Il siero di controllo ed i pool di siero devono essere analizzati con ciascuna seduta di calibratori e di campioni paziente. I risultati generati dall'analisi dei campioni di controllo devono essere valutati per garantirne l'accettabilità mediante metodi statistici idonei. Nei saggi nei quali uno o più valori dei campioni di controllo qualità sono al di fuori dei limiti accettabili, i risultati per il campione del paziente non devono essere ritenuti validi.

Se la densità ottica (OD 450 nm) del calibratore A dopo l'azzeramento è $\geq 0,100$, la curva non sarà valida e pertanto i risultati del paziente dovranno essere esclusi.

12 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il kit PTH (Parathyroid) Intact ELISA non presenta alcun "effetto gancio ad alte dosi" con campioni combinati con 2.100.000 pg/mL di PTH intatto. Tuttavia, i campioni con livelli di PTH intatto superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti e riesaminati per produrre valori corretti.

Analogamente a qualsiasi analita impiegato come elemento diagnostico aggiuntivo, i risultati del PTH intatto vanno interpretati con attenzione, all'interno del quadro clinico complessivo e alla luce di altri test diagnostici correlati.

A causa del rapporto fra PTH e il calcio in vari disordini, i risultati PTH devono essere interpretati nel contesto del calcio sierico e dell'anamnesi clinica del paziente.

Il kit PTH (Parathyroid) Intact ELISA non rileverà il PTH non intatto (1-84) quali i frammenti di PTH (7-84). Un frammento di PTH (7-84) può causare risultati falsamente elevati di PTH intatto in pazienti con funzione renale anomala, perché questi pazienti possono avere nel sangue varie concentrazioni del frammento di PTH (7-84). In pazienti con funzione renale anomala, è opportuno interpretare i risultati di PTH intatto con cautela e non prendere decisioni di gestione del paziente basate unicamente sul risultato di PTH intatto.

I supplementi contenenti alti livelli di biotina, come quelli commercializzati per i capelli, la pelle e le unghie, possono contenere una quantità di biotina interferente. Livelli di biotina superiori alla dose giornaliera raccomandata possono interferire con il test ed è pertanto importante discutere con gli operatori sanitari ed i pazienti dell'assunzione di biotina durante la raccolta dei campioni per evitare errori nei risultati. I risultati mostrano che l'interferenza più significativa è stata riscontrata a una concentrazione di D-biotina pari a 5 ng/mL.

I campioni prelevati da pazienti abitualmente esposti ad animali o prodotti di siero animale possono contenere anticorpi eterofili che interagiscono con gli anticorpi del reagente e che possono provocare falsi risultati elevati. Questo saggio è stato formulato in modo da ridurre il rischio di un'interferenza di questo genere. È tuttavia possibile che si manifestino potenziali interazioni tra sieri e i componenti del test.

13 VALORI PREVISTI

I livelli di PTH intatto sono stati misurati mediante il test PTH (Parathyroid) Intact ELISA in 148 individui in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti.

I valori ottenuti sono compresi tra 9,0 a 94 pg/mL per siero.

Sulla base di test statistici di asimmetria e curtosi, la popolazione, una volta trasformata a livello logaritmico, segue la distribuzione normale o gaussiana.

La media geometrica e ± 2 deviazioni standard calcolate sono comprese tra 10,4 a 66,5 pg/mL per siero.

14 ATTERISTICHE DELLA PROCEDURA**14.1 Tracciabilità**

I calibratori PTH intatti DRG sono tracciabili allo standard internazionale OMS per la preparazione di PTH (1-84) ricombinante (95/646 NIBSC).

1,0 pg/mL = 1,07 pg/mL NIBSC 95/646

14.2 Accuratezza

Sono stati esaminati trecentonove (309) campioni di pazienti, con valori di PTH intatto compresi tra 1,0 e 833 pg/mL mediante il precedente kit PTH DRG e il kit PTH DRG aggiornato. L'analisi di regressione lineare fornisce i seguenti dati statistici:

DRG ELISA = 1,06 ELISA Kit - 1,49 pg/mL	r = 0,998	N = 309
---	-----------	---------

14.3 Sensibilità

La sensibilità, o limite di rilevabilità, di questo test è definita come singolo valore minimo diverso da zero a un limite di confidenza del 95%.

Il test PTH (Parathyroid) Intact ELISA ha una sensibilità calcolata a 1,57 pg/mL.

14.4 Specificità e reattività incrociata

Gli anticorpi impiegati nel test PTH (Parathyroid) Intact ELISA sono stati purificati mediante cromatografia per affinità, per ottenere una specificità per regioni ben definite della molecola PTH. L'anticorpo PTH marcato con perossidasi riconosce soltanto la regione N-terminale o la sequenza aminoacidica 1-34 della molecola PTH; mentre l'anticorpo biotilato è specifico per il segmento 39-84. Di conseguenza, con questo saggio è possibile rilevare soltanto il PTH intatto, che deve essere legato sia all'anticorpo biotilato sia all'anticorpo coniugato con enzima.

Per ottenere un'ulteriore specificità, coniugazione, biotilazione e i relativi rapporti molari sono stati ottimizzati in modo tale da ridurre al minimo il rilevamento dei frammenti di PTH. Il PTH umano 1-34 a livelli sino a 300 pg/mL e il frammento C-terminale 39-84 a livelli sino a 300.000 pg/mL conferiscono al PTH reattività incrociate molari inferiori rispettivamente al 2% e 0,02%.

Il PTH 7-84 umano a livelli fino a 1000 pg/mL ha mostrato una reattività incrociata del 44,5%.

14.5 Precisione e riproducibilità

La precisione (variazione intra-saggio) del test PTH (Parathyroid) Intact ELISA è stata calcolata da 25 determinazioni replicate su ciascuno dei due campioni.

Variazione intra-saggio

Campione	Valore medio (pg/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	32,4	25	6,08
B	178,2	25	3,68

La precisione totale (variazione inter-saggio) del test PTH ELISA di DRG è stata calcolata dai dati di due campioni ottenuti in 21 saggi diversi, da parte di tre tecnici su tre partite diverse di reagenti.

Variation inter-saggio

Campione	Valore medio (pg/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	30,3	21	3,6
B	159,1	21	2,8

14.6 Recupero

Per determinare il recupero, al siero di tre pazienti diversi sono state aggiunte varie quantità di PTH. I risultati sono descritti nella tabella seguente:

Campione siero	PTH endogeno (pg/mL)	PTH aggiunto (pg/mL)	Valore previsto (pg/mL)	Valore misurato (pg/mL)	Recupero (%)
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%

Media 103%

14.7 Linearità delle diluizioni del campione paziente: parallelismo

I campioni sierici di quattro pazienti sono stati diluiti con il reagente 3 (il diluente per la scala di lettura dei campioni paziente). I risultati, espressi in pg/mL, sono indicati di seguito:

Campione	Diluizione	Previsto	Osservato	% osservato ÷ previsto
A	Non diluito	-	322	-
	1:2	161	148	92%
	1:4	80,5	73,1	91%
	1:8	40,3	41,5	103%
B	Non diluito	-	230	-
	1:2	115	97	84%
	1:4	58	55	95%
	1:8	29	30	103%
C	Non diluito	-	176	-
	1:2	88	82	93%
	1:4	44	45	102%
	1:8	22	24	109%
D	Non diluito	-	426	-
	1:2	213	192	90%
	1:4	107	90	84%
	1:8	53	47	89%

Media 95%

1 USO PREVISTO

El enzoinmunoanálisis para la detección de paratirina intacta de DRG se utiliza para la determinación cuantitativa de paratirina intacta en el suero humano.

Este análisis se destina a uso diagnóstico *in vitro*.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La PTH (hormona paratiroidea o paratirina) se biosintetiza en la glándula paratiroidea como una hormona preproparatiroidea, un precursor molecular mayor que consta de 115 aminoácidos. Después de la segmentación intracelular de una secuencia de 25 aminoácidos, la hormona preproparatiroidea se convierte en una hormona proparatiroidea polipéptida intermedia de 90 aminoácidos. Con una modificación proteolítica adicional, la hormona proparatiroidea se convierte luego en la paratirina, un polipéptido de 84 aminoácidos. En las personas sanas, la regulación de la secreción de paratirina normalmente se produce mediante una acción de retroinhibición de calcio sérico en las glándulas paratiroideas. La PTH intacta es biológicamente activa y desaparece muy rápidamente de la circulación con una semivida inferior a 4 minutos¹. La PTH experimenta una proteólisis mayormente periférica en las glándulas paratiroideas, particularmente en el hígado aunque también en los riñones y los huesos, a fin de producir fragmentos de N-terminal, fragmentos de C-terminal y fragmentos de la región media con un mayor período de vida. En las personas que padecen una insuficiencia renal, los análisis de PTH de C-terminal y PTH de la región media generalmente arrojan resultados de PTH elevada, como se refleja en la alteración de la depuración renal².

3 SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Los análisis de PTH intacta son importantes para establecer una diferenciación entre el hiperparatiroidismo primario y otras formas de hipercalcemia (en las que no interviene la glándula paratiroidea), como tumores malignos, sarcoidosis e hipertiroidismo². La medición de la paratirina es la manera más específica de realizar el diagnóstico del hiperparatiroidismo primario. En presencia de una hipercalcemia, un nivel elevado de la paratirina establece virtualmente el diagnóstico. En más del 90% de los pacientes con hiperparatiroidismo primario, la paratirina será elevada³.

La otra causa más común de hipercalcemia, denominada hipercalcemia de tumor maligno, se asocia con niveles suprimidos de la paratirina³ o niveles de PTH dentro del intervalo normal⁴. Cuando se traza el nivel de PTH intacta contra el calcio sérico, la concentración de PTH intacta en pacientes con hipercalcemia de tumor maligno es casi siempre demasiado baja al interpretarse en relación con el calcio sérico elevado^{3,4,5}.

Contrariamente a lo que sucede con la PTH de C-terminal y de la región media, que generalmente son muy elevadas en personas con insuficiencia renal, los análisis de PTH intacta están menos influenciados por la función renal deteriorada⁵.

Los valores de PTH generalmente no pueden detectarse en la hipocalcemia producida por hipoparatiroidismo total, pero se encuentran dentro del intervalo normal en la hipocalcemia producida por la inhibición o la pérdida parcial la función paratiroidea.

4 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El inmunoanálisis para la detección de PTH intacta de DRG es un inmunoanálisis [ELISA] para la medición de la cadena de PTH biológicamente intacta de 84 aminoácidos. Se han purificado dos anticuerpos policlonales de cabra diferentes a PTH humana mediante la cromatografía por afinidad, a fin de que los mismos sean específicos de regiones bien definidas en la molécula de PTH. Un anticuerpo está preparado para enlazar sólo la región media y la PTH de C-terminal de 39-84, estando el mismo biotinilado. El otro anticuerpo está preparado para enlazar sólo la PTH 1-34 de N-terminal, estando marcado con peroxidasa de rábano [HRP] para detección.

Pocillo de estreptavidina - Anti-PTH biotinilada (39-84) - PTH intacta - Anti-PTH conjugada con HRP (1-34)

Si bien los fragmentos de C-terminal y los fragmentos de la región media están enlazados por la anti-PTH (39-84) biotinilada, sólo la PTH 1-84 intacta forma el complejo sándwich (intercalado) necesario para la detección. La capacidad del anticuerpo biotinilado y el micropocillo recubierto con estreptavidina se han ajustado para exhibir la interferencia insignificante de fragmentos inactivos, incluso en niveles muy elevados.

En este análisis, los calibradores, los controles o las muestras de los pacientes se incuban simultáneamente con el anticuerpo marcado con enzimas y un anticuerpo acoplado con biotina en un pocillo de microplaca recubierto con estreptavidina.

Al final de la incubación del análisis, el micropocillo se lava para eliminar componentes sueltos y la enzima enlazada a la fase sólida se incubaba con el sustrato, tetrametilbencidina (TMB). Se agrega luego una solución de parada ácida para interrumpir la reacción, cambiándose el color a amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de PTH intacta en la muestra. Se genera una curva dosis-respuesta de la unidad de absorbencia frente a la concentración mediante la utilización de los resultados obtenidos de los calibradores. Las concentraciones de PTH intacta presentes en los controles y las muestras de pacientes se determinan directamente a partir de esta curva.

5 COMPONENTES DEL KIT

Componentes del kit	Descripción	Cantidad
RGT 1 = Reactivo 1	Anticuerpo de PTH biotinilado	1 x 7,0 mL
RGT 2 = Reactivo 2	Anticuerpo de PTH marcado con peroxidasa (enzima)	1 x 7,0 mL
RGT B = Reactivo B	Sustrato TMB [tetrametilbencidina]	1 x 20 mL
RGT 3 = Reactivo 3	Diluyente [suero equino] para la escala de lectura de muestras de pacientes	1 x 2 mL
RGT A = Reactivo A	Concentrado de lavado para ELISA [Salino con agente tensioactivo]	1 x 30 mL
SOLN = Solución de parada	Solución de parada para ELISA [ácido sulfúrico 1 N]	1 x 20 mL
RGT 4 = Reactivo 4	Solución de reconstitución con agente tensioactivo	1 x 5 mL
PLA = Microplacas	Un soporte con tiras recubiertas de estreptavidina.	12 tiras de 8 pocillos
CAL = Calibradores A: 0 pg/mL B – F: Consulte el vial Etiquetas para concentraciones exactas	Hormona PTH sintética liofilizada. Calibrador cero liofilizado [solución BSA con suero de cabra]. Los demás calibradores constan de h-PTH sintética (1-84) en solución BSA con suero de cabra.	1 x 0,5 mL por nivel
CTRL = Controles 1 y 2 Consulte el vial Etiquetas para intervalos exactos	Liofilizados. 2 niveles. Hormona PTH sintética (1-84) en solución BSA con suero de cabra.	1 x 0,5 mL por nivel

5.1 MATERIAL Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Lector de microplacas.
- Lavadora de microplacas [si no se puede disponer de una lavadora, se podría aceptar el lavado manual].
- Pipetas de precisión para dosificar 25, 100 y 150 µL.
- (*Opcional*): un dosificador de canales múltiples o un dosificador de repetición para 50, 100 y 150 µL.
- Agitadores de microplaca: DRG ha descubierto que para los diámetros de agitador indicados a continuación, los kits de estreptavidina mantendrán una respuesta de rendimiento óptima en las siguientes configuraciones de velocidad:

Agitadores de microplaca	Diámetro de agitador	Configuración de velocidad:
Orbitario	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 rpm
Lineal	25 mm (0.098 in)	170 ± 10 rpm

6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

Si bien el diseño específico de los reactivos suministrados en este kit garantiza la ausencia de componentes de la sangre humana, las muestras de pacientes, que pueden presentar anticuerpos de HBsAg, HBcAg o VIH, deben considerarse un riesgo biológico potencial. Deben tomarse las precauciones habituales en la manipulación de dichas muestras, como se hace con las muestras de pacientes no analizadas.

La solución de parada consiste en ácido sulfúrico 1 N. Se trata de un ácido potente. Si bien el mismo se encuentra diluido, debe manipularse con cuidado. Puede producir quemaduras y debe manipularse con guantes, gafas y ropa protectora adecuada. Cualquier derrame debe enjuagarse inmediatamente con abundante cantidad de agua. No respire cuando advierta el vapor del mismo y evite su inhalación.

Si se observa turbidez en algún reactivo, no realice el ensayo y póngase en contacto con su distribuidor.

Se encuentran a la venta diversos tipos de agitador con diferentes especificaciones. En caso de que el agitador de microplaca no se encuentre dentro del intervalo especificado anteriormente, se anima a cada laboratorio a establecer su propio intervalo óptimo.

7 RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

La determinación de PTH intacta debe realizarse con suero o plasma (EDTA).

El plasma (EDTA) ha demostrado una óptima estabilidad de PTH en comparación con el suero⁶.

Para realizar un análisis de la muestra por duplicado, se requiere 50 µL de suero o plasma (EDTA).

Recolecte sangre completa sin utilizar un tubo con anticoagulante o azul [EDTA]. Después de permitir que la sangre se coagule, debe separarse inmediatamente el suero o el plasma, preferentemente en una centrifuga refrigerada y almacenarse -20 °C como mínimo.

Las muestras de suero pueden almacenarse hasta 8 horas a 2 °C - 8 °C.

Las muestras de suero congeladas a -20 °C permanecen estables por un máximo de 4 meses.

8 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

Almacene todos los componentes del kit a 2 °C - 8 °C.

1. Todos los reactivos, excepto los calibradores, los controles de kit y el concentrado de lavado, están listos para usar. Almacene todos los reactivos a 2 °C - 8 °C.
2. En cada uno de los **calibradores** (del Calibrador A al F) y en los **controles** 1 y 2 del kit, reconstituya cada vial con 500 µL del Reactivo 4 (solución de reconstitución) y mezcle. Permita que el vial repose 10 minutos y luego mezcle por completo, invirtiendo con cuidado el envase para obtener la reconstitución total. **Utilice los calibradores y los controles lo antes posible luego de la reconstitución. Congele (a -20 °C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos.** Los estándares y los controles permanecen estables a -20 °C durante 6 semanas luego de la reconstitución, con un máximo de 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento al manipularse según lo recomendado en la sección "Notas de procedimiento".
3. Reactivo A: **concentrado de lavado**: mezcle el contenido del concentrado de lavado por completo. Si el concentrado de lavado presenta signos de precipitación debido al almacenamiento a una temperatura menor, como podría ser 4 °C, disuélvalo colocando el vial en un baño María o en el horno a 37 °C y revuélvalo. Agregue el concentrado de lavado (30 mL) a 570 mL de agua destilada o desionizada y mezcle. La solución de lavado diluida permanece estable por 90 días cuando la misma se almacena a temperatura ambiente.

9 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Coloque una cantidad suficiente de **Tiras recubiertas de estreptavidina** en un soporte para ejecutar la totalidad de los seis (6) calibradores de PTH, del calibrador A al F de los CALIBRADORES DE PTH intacta [la concentración exacta se indica en la etiqueta del vial], los sueros de control de calidad y las muestras de pacientes. Como mínimo, designe dos pocillos que sirvan como “blancos”. Consulte el paso 9 para la lectura de placas final.
2. Coloque **25 µL** de los calibradores, los controles y las muestras en una pipeta y viértala en el pocillo designado o asignado. **Congele (a -20 °C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos.**
3. Agregue o vierta **50 µL** del Reactivo 1 (Anticuerpo biotinilado) en cada uno de los pocillos que ya contengan los calibradores, los controles y las muestras.
4. Agregue o vierta **50 µL** del Reactivo 2 (Anticuerpo marcado con enzimas) en los mismos pocillos. Cubra la microplaca con papel de aluminio o una bandeja para evitar su exposición a la luz, y colóquela en un **agitador** preparado a la configuración recomendada (consulte la sección 5.1) durante **3 horas ± 30 minutos** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
5. Primero, aspire el fluido completamente y luego lave/aspire cada pocillo cinco (5) veces con la solución de lavado activa (preparada a partir del Reactivo A), utilizando una lavadora de microplacas automática. El volumen de solución de lavado debe prepararse para verter 0,35 mL en cada pocillo.
6. Agregue o vierta **150 µL** del Reactivo B (sustrato TMB) en cada uno de los pocillos, excepto en los pocillos de blanco.
7. Con una cubierta adecuada para evitar la exposición a la luz, coloque la o las microplacas en un **agitador** preparado a la configuración recomendada (consulte la sección 5.1) durante **30 ± 5 minutos** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
8. Agregue o vierta **100 µL** de la solución de parada en cada uno de los pocillos, excepto en los pocillos de blanco. Mezcle suavemente.
9. Antes de la lectura, asegúrese de que los dos pocillos de blanco mencionados en el paso 1 se hayan llenado con 250 µL de agua destilada o desionizada. Utilice los pocillos de blanco para hacer el blanco del lector de placas, de conformidad con las instrucciones del fabricante.*
Determine la absorbancia de la solución en los pocillos en los 10 minutos siguientes; para ello, use un lector de microplacas a **450 nm**. **Lea la placa otra vez** con el lector a **405 nm**, también con agua destilada o desionizada.

*Si, por motivos técnicos, no es posible ajustar el lector de placas ELISA a cero usando el blanco, sustraiga el valor de absorbancia del blanco a todos los demás valores de absorbancia para obtener resultados.

Nota: la segunda lectura está destinada a extender la validez analítica de la curva de calibración hasta el valor representado por el calibrador más alto, que es aproximadamente de 700 - 1.000 pg/mL. Por lo tanto, las muestras de pacientes con PTH > 200 pg/mL pueden cuantificarse contra una curva de calibración que consista en las lecturas ascendentes hasta la concentración equivalente al calibrador más alto, utilizando la lectura de 405 nm, lejos de la longitud de onda de absorbencia máxima. En general, las muestras de pacientes y controles deben leerse utilizando los 450 nm para concentraciones de PTH hasta 200 pg/mL. Las concentraciones de PTH superiores a 200 pg/mL deben interpolarse mediante la lectura de 405 nm.

10. Con los valores de absorbencia finales obtenidos en el paso anterior, trace una curva de calibración mediante una interpolación punto a punto o una interpolación logística de 4 parámetros o utilizando una regla flexible cúbica para cuantificar la concentración de la PTH intacta.

9.1 NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- La PTH intacta 1-84 es una molécula muy lábil. Prepare el análisis inmediatamente después de realizada la reconstitución o el descongelamiento de todos los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
- Se recomienda realizar los análisis de todos los calibradores, los controles y las muestras de pacientes por duplicado. Las unidades de absorbencia promedio de grupos duplicados deben utilizarse entonces para reducir datos y calcular resultados.
- Las muestras deben colocarse en pipetas y verterse en el pocillo con una mínima cantidad de burbujas de aire. Para lograrlo, se recomienda utilizar la técnica de “pipeta inversa” descrita en el folleto de los fabricantes de pipetas incluido en el paquete.
- Las muestras de pacientes con valores superiores al calibrador más alto (Calibrador F), que oscila entre 700 – 1.000 pg/mL (vea la concentración exacta en la etiqueta del vial), pueden diluirse con el Reactivo 3 (diluyente de muestra) y volver a analizarse. Multiplique el resultado por el factor de dilución.
- Los reactivos de números de lote diferentes no deben intercambiarse.
- Si lo prefiere, mezcle el Reactivo 1 (Anticuerpo biotinilado) y el Reactivo 2 (Anticuerpo marcado con enzimas) en una botella ámbar limpia, empleando a tal fin volúmenes iguales y cantidades suficientes para el análisis. Luego utilice 100 µL del anticuerpo mezclado en cada pocillo. Este método alternativo debe reemplazar al Paso (3) y (4), seguido por la incubación con agitador orbitario.

10 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Método de ajuste de la curva:

los programas informáticos que utilizan la regla flexible cúbica o 4 PL (logística de 4 parámetros) en general pueden ser adecuados.

Nota importante:

si la DO a 450 nm del calibrador A después de la puesta a cero es $\geq 0,100$, la curva no es válida y no se deben notificar los resultados del paciente.

Datos de muestra a 450 nm [lectura de unidad de absorbancia bruta contra agua destilada o desionizada]

Pocillo de la microplaca	1. ^a lectura Unidad de absorbancia	2. ^a lectura Unidad de absorbancia	Promedio Unidad de absorbancia	PTH intacta pg/mL	PTH Intacta pg/mL – Resultado para informar
Calibrador A	0,020	0,016	0,018		0
Calibrador B	0,056	0,051	0,054		7
Calibrador C	0,124	0,119	0,122		18
Calibrador D	0,388	0,393	0,391		55
Calibrador 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
Muestra de paciente 1	0,147	0,136	0,142	19,1	19,1
Muestra de paciente 2	0,407	0,409	0,408	58,5	58,5
Muestra de paciente 3	2,375	2,454	2,415	> 200	*
Muestra de paciente 4	3,725	3,725	3,725	> 200	*

* Debido a que la lectura de la concentración es > 200 pg/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en 405 nm, como se muestra en los **datos de muestra a 405 nm** en la tabla incluida a continuación.

Datos de muestra a 405 nm [lectura de unidad de absorbancia bruta contra agua destilada o desionizada]

Pocillo de la microplaca	1. ^a lectura Unidad de absorbancia	2. ^a lectura Unidad de absorbancia	Promedio Unidad de absorbancia	PTH intacta pg/mL	PTH intacta pg/mL – Resultado para informar
Calibrador A	0,014	0,008	0,011		0
Calibrador D	0,124	0,128	0,126		55
Calibrador E	0,428	0,425	0,427		210
Calibrador 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	¶
Muestra de paciente 1	0,049	0,043	0,046	< 200	¶
Muestra de paciente 2	0,132	0,133	0,133	< 200	¶
Muestra de paciente 3	0,758	0,782	0,770	401	401
Muestra de paciente 4	1,314	1,321	1,318	> 700	←

- ¶ Para las muestras con una lectura < 200 pg/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en 450 nm, como se muestra en los **Datos de muestra a 450 nm** en la tabla incluida a continuación. Esta práctica debe producir los resultados con óptima sensibilidad del análisis.
- ¶ Si bien la lectura para Control (2) es < 200 pg/mL, se recomienda que el resultado real se lea y registre para la evaluación de control de calidad. Además, la absorbancia para el Control 2 es suficientemente alta para ser analíticamente válida.
- ← La lectura de absorbancia está fuera de escala o es superior a la absorbancia promedia del calibrador más alto. La muestra debe repetirse con la dilución.

NOTA: Los datos presentados **sólo pretenden ser ilustrativos** y no deben utilizarse en lugar de los datos generados durante el análisis.

11 CONTROL DE CALIDAD

El suero de control o los grupos de sueros deben analizarse con cada ejecución de los calibradores y las muestras de pacientes. Los resultados generados a partir del análisis de las muestras de control deben evaluarse para su aceptación utilizando los métodos estadísticos adecuados. Es posible que, en análisis con uno o más valores de muestra de control de calidad que se encuentren fuera de los límites aceptables, los resultados de la muestra del paciente no sean válidos. Si la DO a 450 nm del calibrador A después de la puesta a cero es $\geq 0,100$, la curva no es válida y no se deben notificar los resultados del paciente.

12 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El kit ELISA para PTH de DRG no ha exhibido ningún "efecto gancho de alta dosis" en muestras que contenían 2.100.000 pg/mL de PTH intacta.

Sin embargo, las muestras con niveles de PTH intacta superiores al calibrador más alto deben diluirse y volver a analizarse para obtener los valores correctos.

A semejanza de lo que sucede con cualquier analito utilizado como adjunto diagnóstico, los resultados de PTH intacta deben interpretarse cuidadosamente con las presentaciones clínicas generales y otras pruebas de diagnóstico complementarias.

Debido a la relación entre la PTH y el calcio en varias enfermedades, los resultados de la PTH se deben interpretar en el contexto del calcio sérico y la historia clínica del paciente.

El inmunoanálisis para la detección de PTH intacta de DRG detectará la PTH no intacta (1-84) como el fragmento de la PTH (7-84). El fragmento PTH (7-84) puede producir resultados falsamente elevados de la PTH intacta en pacientes con función renal anómala, ya que estos pacientes pueden tener varias concentraciones del fragmento de PTH (7-84) en su sangre. En pacientes con función renal anómala, debe interpretar los resultados de la PTH intacta con precaución y no tome decisiones de tratamiento del paciente sobre el resultado de PTH intacta solo.

Los suplementos que contienen niveles altos de biotina, como los que se comercializan para el cuidado del pelo, la piel y las uñas, pueden contener cantidades interferentes de biotina. Unos niveles más altos de biotina que la dosis diaria recomendada pueden causar interferencias con el ensayo. Por lo tanto, es importante comunicarse con los profesionales sanitarios y con los pacientes sobre la dosis de biotina al recoger las muestras para evitar resultados de pruebas incorrectos. Los resultados muestran que 5 ng/mL de D-Biotina es la máxima concentración en la que no se ha observado ninguna interferencia significativa.

Las muestras de pacientes habitualmente expuestos a animales o a productos de suero animal pueden contener anticuerpos heterófilos que reaccionen con anticuerpos reactivos, lo cual podría causar resultados falsamente elevados. Este ensayo se ha formulado para mitigar el riesgo de este tipo de interferencia. Sin embargo, pueden producirse posibles interacciones entre los sueros del paciente y los componentes de la prueba.

13 VALORES PREVISTOS

Los niveles de PTH intacta se midieron en ciento cuarenta y ocho (148) personas aparentemente normales en EE. UU. con la Prueba ELISA para PTH intacta.

Los valores obtenidos oscilaron entre 9,0 y 94 pg/mL para suero.

Según las pruebas estadísticas sobre asimetría y curtosis, la población, cuando se transforma logarítmicamente, sigue la distribución gaussiana o normal.

Las desviaciones estándar de la media geométrica de ± 2 se calcularon entre 10,4 y 66,5 pg/mL para suero.

14 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

14.1 Trazabilidad

Los calibradores de la PTH intacta de DRG son trazables según el estándar internacional NIBSC 95/646 de la OMS de la PTH (1-84) recombinante.

1,0 pg/mL = 1,07 pg/mL NIBSC 95/646

14.2 Precisión

Trescientas nueve (309) muestras de pacientes, con valores de PTH intacta que oscilan entre 1,0 y 833 pg/mL se analizaron mediante el anterior kit de PTH de DRG y el kit actualizado de PTH de DRG. El análisis de regresión lineal brinda las siguientes estadísticas:

DRG ELISA = 1,06 ELISA Kit - 1,49 pg/mL	r = 0,998	N = 309
---	-----------	---------

14.3 Sensibilidad

La sensibilidad, o límite de detección mínimo, de este ensayo se define como el valor individual más pequeño, que puede distinguirse de cero en el límite de confianza de 95%.

La prueba ELISA para PTH de DRG tiene una sensibilidad calculada de 1,57 pg/mL.

14.4 Especificidad y reactividad cruzada

Los anticuerpos utilizados en la prueba ELISA para PTH de DRG se purificaron mediante cromatografía por afinidad, a fin de que los mismos sean específicos de regiones bien definidas en la molécula de PTH. El anticuerpo marcado con peroxidasa sólo reconoce la región de N-terminal o la secuencia 1-34 de aminoácidos de la molécula PTH, mientras que el anticuerpo biotinilado es específico del segmento 39-84. En consecuencia, en este análisis sólo puede detectarse la PTH intacta con enlace de la enzima conjugada y los anticuerpos biotinilados.

Para obtener una mejor especificidad de este análisis, se ha optimizado la conjugación, la biotinilación y las proporciones molares a fin de minimizar la detección de fragmentos de PTH. La PTH humana 1-34 a niveles de hasta 300 pg/mL y el fragmento 39-84 de C-terminal a niveles de hasta 300.000 pg/mL proporcionan reactividades cruzadas molares a la PTH inferiores al 2% y 0,02%, respectivamente.

La PTH humana 7-84 a niveles de hasta 1.000 pg/mL mostró reactividad cruzada del 44,5%.

14.5 Precisión y reproducibilidad

La precisión (variación intraanálisis) de la prueba ELISA para PTH de DRG se calculó a partir de 25 determinaciones repetidas en cada una de las dos muestras.

Variación intraanálisis

Muestra	Valor medio (pg/mL)	N	Coficiente de variación %
A	32.4	25	6.08
B	178.2	25	3.68

La precisión total (variación interanálisis) de la prueba ELISA para PTH de DRG se calculó a partir de los datos de dos muestras obtenidas por tres técnicos en 21 análisis diferentes en tres lotes de reactivos diferentes.

Variación interanálisis

Muestra	Valor medio (pg/mL)	N	Coficiente de variación %
A	30.3	21	3.6
B	159.1	21	2.8

14.6 Recuperación

Se agregaron diversas cantidades de PTH 1-84 a tres sueros de pacientes diferentes para determinar la recuperación. Los resultados se describen en la siguiente tabla:

Muestra de suero	PTH endógena (pg/mL)	PTH añadida (pg/mL)	Valor previsto medido (pg/mL)	Valor medido (pg/mL)	Recuperación (%)
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%

Promedio 103%

14.7 Linealidad de diluciones de muestras de pacientes: paralelismo

Se diluyeron cuatro muestras de suero de pacientes con el Reactivo 3 (el diluyente para muestras de pacientes se encuentra fuera de escala). A continuación, se muestran los resultados en pg/mL:

Muestra	Dilución	Valor previsto	Valor observado	% observado ÷ esperado
A	Sin diluir	-	322	-
	1:2	161	148	92%
	1:4	80,5	73,1	91%
	1:8	40,3	41,5	103%
B	Sin diluir	-	230	-
	1:2	115	97	84%
	1:4	58	55	95%
	1:8	29	30	103%
C	Sin diluir	-	176	-
	1:2	88	82	93%
	1:4	44	45	102%
	1:8	22	24	109%
D	Sin diluir	-	426	-
	1:2	213	192	90%
	1:4	107	90	84%
	1:8	53	47	89%

Promedio 95%

1 APPLICATION

Le test PTH intacte ELISA sert à déterminer la quantité de PTH intacte (hormone parathyroïdienne intacte ou iPTH) dans le sérum humain. Ce dosage sert uniquement à un diagnostic in vitro.

2 RÉSUMÉ EXPLICATIF

La PTH (hormone parathyroïdienne ou parathormone ou parathyrine) est synthétisée par le corps dans la glande parathyroïde en tant qu'hormone pré-parathyroïdienne, un précurseur moléculaire plus large composé de 115 acides aminés. À la suite d'un clivage intracellulaire séquentiel d'une chaîne de 25 acides aminés, une hormone pré-parathyroïdienne est convertie en hormone parathyroïdienne intermédiaire, un polypeptide composé de 90 acides aminés. Une modification protéolytique ultérieure entraîne la conversion de l'hormone parathyroïdienne en hormone parathyroïdienne, un polypeptide de 84 acides aminés. Chez les individus sains, la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne est normalement régulée par un rétrocontrôle négatif du calcium dans le sérum sur les glandes parathyroïdes. L'iPTH est biologiquement active et est très rapidement éliminée de la circulation, sa demi-vie étant de moins de quatre minutes¹. L'hormone parathyroïdienne subit une protéolyse dans les glandes parathyroïdes, mais plus généralement en périphérie, en particulier dans le foie, les reins et les os pour former des fragments N-terminal et des fragments C-terminal et région centrale à durée de vie plus longue. Chez les sujets souffrant d'insuffisance rénale, les dosages de PTH dans les fragments C-terminal et région centrale donnent généralement des résultats d'hormone parathyroïdienne élevés, qui se traduisent par une altération de la clairance rénale².

3 IMPORTANCE CLINIQUE

Les dosages d'iPTH sont importants pour différencier l'hyperparathyroïdie primaire d'autres formes d'hypercalcémie (non liées à la glande parathyroïde), dues à une affection maligne, à une sarcoidose ou à une thyrotoxicose². Mesurer la quantité d'hormone parathyroïdienne est la méthode la plus spécifique pour diagnostiquer une hyperparathyroïdie primaire. En présence d'hypercalcémie, un taux élevé d'hormone parathyroïdienne établit pratiquement le diagnostic. Chez les patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire, le taux d'hormone parathyroïdienne sera élevé³ dans plus de 90 % des cas.

L'autre cause la plus courante d'hypercalcémie, à savoir une tumeur maligne, est associée à de bas niveaux d'hormone parathyroïdienne³ ou à des niveaux PTH normaux⁴. Quand on a relevé le niveau d'iPTH pour le comparer à la quantité de calcium dans le sérum, on a presque toujours constaté que la concentration d'iPTH, chez les patients atteints d'hypercalcémie due à une tumeur maligne, est anormalement basse par rapport au taux élevé de calcium^{3,4,5}.

Alors que les taux de PTH dans les fragments C-terminal et région centrale sont, en général, excessivement élevés chez les sujets souffrant d'insuffisance rénale, les dosages de PTH intacte sont moins influencés par cette détérioration de la fonction rénale⁵.

Dans l'hypocalcémie due à une hypoparathyroïdie totale, les quantités de PTH sont généralement imperceptibles mais elles se présentent à des niveaux normaux si l'hypocalcémie résulte d'une perte partielle ou d'une inhibition des fonctions de la glande parathyroïde.

4 PRINCIPE DU TEST

Le dosage immunologique PTH (Parathyroid) Intact ELISA est un test ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] à deux sites (« en sandwich »), servant à mesurer la chaîne de PTH biologiquement intacte, composée de 84 acides aminés. Deux différents anticorps polyclonaux de chèvres anti-PTH humaine ont été purifiés par chromatographie d'affinité afin de pouvoir être appliqués spécifiquement à des régions bien définies sur la molécule de PTH. Un des anticorps, biotinylé, est préparé pour se lier uniquement à la séquence 39 à 84 de la PTH dans les fragments C-terminal et région centrale.

L'autre anticorps est préparé pour se lier uniquement à la section 1 à 34 de la PTH dans le fragment N-terminal et est marqué à la peroxydase de raifort (HRP) pour la détection.

Puits recouvert de Streptavidine - Anti-PCTH (39-84) biotinylé -- PTH intacte -- Conjugué HRP-Anti-ACTH (1-34)

Bien que les fragments C-terminal et région centrale soient liés par l'anti-PTH (39 à 84) biotinylé, seule la séquence 1 à 84 de la PTH intacte forme le complexe en sandwich nécessaire pour la détection. La capacité de l'anticorps biotinylé et le micropuits recouvert de streptavidine ont été tous les deux réglés de manière à ne pas subir d'interférence des fragments inactifs, même à des niveaux très élevés.

Dans ce dosage, les étalons, les contrôles ou les échantillons des patients ont été simultanément incubés avec l'anticorps marqué à l'enzyme et avec un anticorps couplé à la biotine dans un puits à microplaques recouvert de streptavidine. À la fin de l'incubation, les composants libres sont retirés du puits par lavage et l'enzyme liée à la phase solide est incubée avec le substrat, le tétraméthylbenzidine (TMB). On ajoute alors une solution bloquante acide pour arrêter la réaction dont la couleur devient jaune. L'intensité de la couleur jaune est directement proportionnelle à la concentration de PTH intacte dans l'échantillon. À l'aide des résultats fournis par les étalons, on crée une courbe dose-réponse indiquant l'unité d'absorbance en fonction de la concentration. Les concentrations de PTH intacte présentes dans les contrôles et les échantillons des patients sont directement déterminées à partir de cette courbe.

5 COMPOSANTS DE LA TROUSSE

Éléments de la trousse	Description	Quantité
RGT 1 = Réactif 1	Anticorps anti-PTH biotinylé	1 x 7,0 mL
RGT 2 = Réactif 2	Anticorps anti-PTH marqué à l'enzyme peroxydase	1 x 7,0 mL
RGT B = Réactif B	Substrat TMB [tétraméthylbenzidine]	1 x 20 mL
RGT 3 = Réactif 3	Diluant [sérum de cheval] pour les échantillons de patients lus en dehors des limites	1 x 2 mL
RGT A = Réactif A	Solution concentrée de lavage ELISA [saline avec surfactant]	1 x 30 mL
SOLN = Solution bloquante	Solution bloquante ELISA (acide sulfurique 1N)	1 x 20 mL
RGT 4 = Réactif 4	Solution de reconstitution contenant le surfactant	1 x 5 mL
PLA = Microplaques	Un support avec des bandelettes recouvertes de streptavidine.	12 x 8 bandelettes de puits
CAL = Étalons A : 0 pg/mL B – F : Voir les concentrations exactes sur les étiquettes des tubes	PTH humaine synthétique lyophilisée. Étalon zéro lyophilisé [solution BSA avec du sérum de chèvre]. Tous les autres étalons consistent en PTH humaine (1 à 84) synthétique dans une solution BSA avec du sérum de chèvre.	1 x 0,5 mL par niveau
CTRL = Contrôles 1 et 2 Voir les limites exactes sur les étiquettes des	Lyophilisés. 2 niveaux. PTH humaine (1 à 84) synthétique dans une solution BSA avec du sérum de chèvre.	1 x 0,5 mL par niveau

5.1 MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de microplaques
- Laveur de microplaques [sinon, un lavage manuel peut être acceptable]
- Pipettes de précision pour 25, 100 et 150 µL
- (*Facultatif*) : Distributeur multi-canaux ou à répétition pour 50, 100 et 150 µL
- Agitateurs pour microplaques : DRG a mis au point des agitateurs aux diamètres indiqués ci-dessous ; les kits de streptavidine assureront une réponse de performance optimale aux réglages de la vitesse suivants :

Agitateurs pour microplaques	Diamètre d'agitation	Réglage de la vitesse
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 tr/min
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 tr/min
Linéaire	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 tr/min

6 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Bien que les réactifs fournis dans cette trousse aient été spécifiquement composés pour ne pas contenir d'éléments de sang humain, les échantillons de patients humains, qui peuvent être positifs aux anticorps HBsAg, HBcAg ou VIH, doivent impérativement être traités comme des risques biologiques potentiellement infectieux. Les précautions d'usage pour la manipulation d'échantillons de patients non testés doivent être suivies.

La solution bloquante consiste en acide sulfurique 1N. Il s'agit d'un acide corrosif. Quoique dilué, il doit être manipulé avec soin. Il est conseillé de porter des gants, des lunettes de sécurité et des vêtements de protection appropriés pour éviter tout risque de brûlure. Laver immédiatement tout acide déversé avec de grandes quantités d'eau. Ne pas respirer la vapeur et éviter l'inhalation.

Si vous constatez une turbidité dans un quelconque réactif, ne réalisez pas l'analyse et contactez votre fournisseur.

Divers types d'agitateurs dotés de caractéristiques techniques différentes sont disponibles dans le commerce. Au cas où l'agitateur pour microplaques ne se situait pas entre les valeurs indiquées ci-dessus, chaque laboratoire est encouragé à définir ses propres limites optimales.

7 PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Le dosage de la PTH intacte doit être effectué avec du plasma EDTA ou du sérum.

On a observé une meilleure stabilité de la PTH avec du plasma EDTA qu'avec du sérum⁶.

Il est nécessaire de disposer de 50 µL de sérum ou de plasma EDTA pour pouvoir doser l'échantillon en double exemplaire.

Prélever du sang entier sans tube avec anticoagulant EDTA (lavande). Après avoir laissé le sang se coaguler, séparer rapidement le sérum ou le plasma avec une centrifugeuse réfrigérée de préférence et conserver à une température inférieure ou égale à -20 °C.

Les échantillons de sérum peuvent être conservés jusqu'à 8 heures entre 2 °C et 8 °C. S'ils sont congelés à -20 °C ils restent stables jusqu'à 4 mois.

8 PRÉPARATION ET STOCKAGE DES RÉACTIFS

Conserver tous les éléments de la trousse entre 2 °C et 8 °C.

1. Tous les réactifs à l'exception des étalons, des contrôles et de la solution concentrée de lavage sont prêts à l'emploi. Conserver tous les réactifs entre 2 °C et 8 °C.
2. Reconstituer chaque fiole des **étalons** (étalon A à F) et des **contrôles** 1 et 2 de la trousse avec 500 µL de Réactif 4 (solution de reconstitution) et mélanger. Laisser reposer pendant 10 minutes, puis mélanger complètement par retournements pour obtenir une reconstitution totale. **Utiliser les étalons et les contrôles dès que possible après reconstitution. Congeler (à -20 °C) les étalons et contrôles restants dès que possible après emploi.** Les normes et les contrôles demeurent stables à -20 °C pendant 6 semaines après reconstitution et supportent jusqu'à 3 cycles de congélation-décongélation, s'ils sont manipulés conformément aux instructions de la section « Remarques sur les procédures ».
3. Réactif A : **Solution concentrée de lavage** : Bien mélanger le contenu de la solution concentrée de lavage. Si un précipité apparaît dans cette solution après conservation à basse température, par exemple 4 °C, le dissoudre en plaçant la fiole dans un bain-marie ou un four à 37 °C et en agitant le contenu. Ajouter la solution concentrée de lavage (30 mL) à 570 mL d'eau distillée ou déminéralisée et mélanger. La solution de lavage active diluée est stable pendant 90 jours si elle est conservée à température ambiante.

9 PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Placer un nombre suffisant de **bandelettes recouvertes de streptavidine** dans un support pour tester tous les six (6) étalons de PTH, ÉTALONS A à F de PTH intacte (la concentration exacte est indiquée sur l'étiquette de la fiole), les sérums de contrôle qualité et les échantillons de patients. Au minimum, désigner deux puits pour servir de « blancs ». **Se référer à l'étape 9 pour la lecture finale de la plaque.**
2. Pipeter **25 µL** d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans le puits approprié. **Congeler (à -20 °C) les étalons et contrôles restants dès que possible après emploi.**
3. Ajouter ou administrer **50 µL** de Réactif 1 (anticorps biotinylé) dans chaque puits contenant les étalons, les contrôles et les échantillons.
4. Ajouter ou administrer **50 µL** de réactif 2 (anticorps marqué à l'enzyme) dans chacun des mêmes puits. Recouvrir la plaque ou les plaques d'une feuille d'aluminium ou avec un plateau afin d'éviter l'exposition à la lumière. Les placer sur un **agitateur** ajusté aux réglages recommandés (voir la section 5.1) pendant **3 heures ± 30 minutes** à température ambiante (22 °C à 28 °C).
5. Aspirer tout le fluide, puis laver ou aspirer chaque puits cinq (5) fois avec la solution de lavage active (préparée avec le Réactif A) dans un laveur de microplaques automatique. Il est recommandé de limiter le volume de solution de lavage à verser dans chaque puits à 0,35 mL.
6. Ajouter ou administrer **150 µL** de Réactif B (substrat TMB) dans chacun des puits, à l'exception des puits vides (« blanc »).
7. Après avoir recouvert la plaque ou les plaques afin d'éviter l'exposition à la lumière, la (ou les) placer les microplaques sur un **agitateur** ajusté aux réglages recommandés (voir la section 5.1) pendant **30 ± 5 minutes** à température ambiante (22 °C à 28 °C).
8. Ajouter ou administrer **100 µL** de solution bloquante dans chacun des puits, à l'exception des puits vides. Mélanger délicatement.

9. Avant de passer aux mesures, assurez-vous que les « puits vides », tels que mentionnés à l'étape 1, sont remplis de 250 µL d'eau distillée ou désionisée. Videz le lecteur de plaque conformément aux instructions du fabricant, en utilisant les puits vides.*Mesurez l'extinction de la solution dans les puits dans un délai de 10 minutes, en utilisant un lecteur de microplaques réglé sur 450 nm. Mesurez la plaque une nouvelle fois avec le lecteur réglé sur 405 nm, toujours avec de l'eau distillée ou désionisée.

*Si, pour des raisons techniques, il est impossible de régler le lecteur de plaques ELISA à zéro en utilisant un puits « vide », soustrayez la valeur d'extinction « vide » de toutes les autres valeurs d'extinction pour parvenir aux résultats.

Remarque : La deuxième lecture permet d'étendre la validité analytique de la courbe d'étalonnage jusqu'à la valeur la plus élevée représentée par un étalon, qui est d'environ 700 – 1000 pg/mL. En conséquence, les échantillons de patients ayant une PTH > 200 pg/mL peuvent être quantifiés et comparés à toutes les valeurs indiquées par la courbe d'étalonnage jusqu'à celle de la concentration la plus élevée, à l'aide d'une lecture à 405 nm, loin de la longueur d'onde de l'absorbance maximale. En général, il est conseillé de lire les échantillons de patients et de contrôles avec un lecteur réglé sur 450 nm pour les concentrations de PTH jusqu'à 200 pg/mL. Les concentrations de PTH supérieures à 200 pg/mL doivent être interpolées avec une lecture à 405 nm.

10. À partir des valeurs finales d'absorbance obtenues dans l'étape précédente, tracer une courbe d'étalonnage utilisant une interpolation par spline cubique, par 4 PL ou point à point pour quantifier la concentration de PTH intacte.

9.1 REMARQUES SUR LES PROCÉDURES

- La PTH intacte 1 à 84 est une molécule très labile. Effectuer le dosage immédiatement après la reconstitution ou la décongélation de tous les étalons, contrôles et échantillons de patients.
- Il est recommandé d'exécuter tous les dosages en double exemplaire. Utiliser ensuite la moyenne des unités d'absorbance des deux séries d'exemplaires pour réduire les données et calculer les résultats.
- Il est conseillé d'éviter la formation de bulles lorsqu'on pipette les échantillons dans les puits. Pour ce faire, suivre la méthode de « pipetage à l'envers » décrite dans la notice incluse dans l'emballage des pipettes.
- Les échantillons de patients dont les valeurs sont supérieures à celles de l'étalon le plus élevé (étalon F), environ 700 - 1000 pg/mL (voir la concentration exacte sur l'étiquette de la fiole), peuvent être dilués avec le Réactif 3 (diluant pour échantillon) et dosés à nouveau. Multiplier le résultat par le facteur de dilution.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.
- De préférence, mélanger des volumes égaux de Réactif 1 (anticorps biotinylé) et de Réactif 2 (anticorps marqué à l'enzyme) et en quantités suffisantes pour le dosage dans un flacon propre de couleur ambre. Verser ensuite 100 µL de ce mélange dans chaque puits. Cette méthode remplace les étapes 3 et 4 de l'autre procédure et doit être suivie de l'incubation dans un agitateur orbital.

10 CALCUL DES RÉSULTATS

Méthode d'ajustement des courbes :

les programmes informatiques utilisant une courbe spline cubique ou 4 PL donnent généralement des résultats convenables.

Remarque importante :

si la lecture à 450 nm de la densité optique (DO) du calibre A après la remise à zéro $\geq 0,100$, la courbe n'est pas valide et les résultats de l'échantillon patient ne devraient pas être reportés.

Données d'échantillon à 450 nm [lecture de l'unité d'absorbance brute par rapport à de l'eau distillée ou déminéralisée]

Puits de microplaque	1 ^{ère} lecture Unité d'absorbance	2 ^{ème} lecture Unité d'absorbance	Moyenne Unité d'absorbance	PTH intacte pg/mL	PTH intacte pg/mL – Résultat à reporter
Étalon A	0,020	0,016	0,018		0
Étalon B	0,056	0,051	0,054		7
Étalon C	0,124	0,119	0,122		18
Étalon D	0,388	0,393	0,391		55
Étalon E	1,335	1,340	1,338		210
Contrôle 1	0,200	0,200	0,200	27,6	27,6
Contrôle 2	0,804	0,794	0,799	119	119
Patient Échantillon 1	0,147	0,136	0,142	19,1	19,1
Patient Échantillon 2	0,407	0,409	0,408	58,5	58,5
Patient Échantillon 3	2,375	2,454	2,415	> 200	*
Patient Échantillon 4	3,725	3,725	3,725	> 200	*

* La concentration lue étant > 200 pg/mL, il est recommandé d'utiliser les données obtenues à 405 nm reportées dans le tableau ci-après, **Données d'échantillon à 405 nm**.

Données d'échantillon à 405 nm [lecture de l'unité d'absorbance brute par rapport à de l'eau distillée ou déminéralisée]

Puits de microplaque	1 ^{ère} lecture Unité d'absorbance	2 ^{ème} lecture Unité d'absorbance	Moyenne Unité d'absorbance	PTH intacte pg/mL	PTH intacte pg/mL – Résultat à reporter
Étalon A	0,014	0,008	0,011		0
Étalon D	0,124	0,128	0,126		55
Étalon E	0,428	0,425	0,427		210
Étalon F	1,309	1,317	1,313		700
Contrôle 1	0,074	0,066	0,070	< 200	¶
Contrôle 2	0,260	0,251	0,256	121	□
Patient Échantillon 1	0,049	0,043	0,046	< 200	¶
Patient Échantillon 2	0,132	0,133	0,133	< 200	¶
Patient Échantillon 3	0,758	0,782	0,770	401	401
Patient Échantillon 4	1,314	1,321	1,318	> 700	⇐

¶ Pour les échantillons dont la lecture est < 200 pg/mL, il est recommandé d'utiliser les données obtenues à 450 nm reportées dans le tableau précédent, **Données d'échantillon à 450 nm**. Cette procédure devrait donner les résultats avec la meilleure sensibilité du dosage.

□ Même si la lecture du contrôle (2) indique une valeur < 200 pg/mL, il est recommandé de lire et d'enregistrer le résultat réel pour l'évaluation du contrôle qualité. En outre, l'absorbance du contrôle 2 est suffisamment élevée pour être valable pour l'analyse.

⇐ La lecture de l'absorbance est en dehors des limites ou supérieure à l'absorbance moyenne de l'étalon le plus élevé. Il est conseillé de retester l'échantillon avec dilution.

REMARQUE : Les données présentées le sont à titre indicatif et ne doivent pas être utilisées à la place des données obtenues lors du dosage.

11 CONTRÔLE QUALITÉ

Il convient d'analyser le sérum ou les groupes de sérum du contrôle à chaque fois qu'on effectue un test d'étalons et d'échantillons de patients. Utiliser des méthodes statistiques appropriées pour évaluer si les résultats de l'analyse d'échantillons de contrôle sont acceptables. Si une ou plusieurs valeurs d'échantillon du contrôle qualité des dosages se situent en dehors des limites acceptables, les résultats de l'échantillon de patient ne devraient pas être considérés comme valables.

Si la lecture à 450 nm de la densité optique (DO) du calibre A après la remise à zéro $\geq 0,100$, la courbe n'est pas valide et les résultats de l'échantillon patient ne devraient pas être reportés.

12 LIMITES DE LA PROCÉDURE

La trousse PTH ELISA n'a montré aucun « effet crochet » avec des échantillons enrichis avec 2100000 pg/mL de PTH intacte. Toutefois, il est conseillé de diluer les échantillons dont les niveaux de PTH intacte sont supérieurs à l'étalon le plus élevé et de les doser à nouveau pour obtenir des valeurs correctes. Comme tout analyte utilisé en complément à un diagnostic, les résultats de PTH intacte doivent être interprétés avec soin en association avec les présentations cliniques globales et tout autre test diagnostique de support.

En raison de la relation entre la PTH et le calcium dans différents troubles, les résultats de la PTH devraient être interprétés en fonction de la quantité de calcium dans le sérum et de l'historique clinique du patient.

Le test PTH (Parathyroid) Intact ELISA détecte la PTH (1 à 84) non-intacte telle que le fragment de PTH (7 à 84). Le fragment de PTH (7 à 84) peut provoquer des résultats faussement élevés de PTH intacte chez les patients ayant une fonction rénale anormale, car ces patients peuvent avoir différentes concentrations de fragment de PTH (7 à 84) dans le sang. Chez les patients ayant une fonction rénale anormale, interpréter les résultats de PTH intacte avec prudence et ne pas prendre de décisions concernant la gestion des patients à partir du seul résultat de PTH intacte.

Les compléments contenant des niveaux de biotine élevés comme ceux commercialisés pour les bienfaits des cheveux, de la peau et des ongles, peuvent renfermer des quantités de biotine nocives. Des niveaux de biotine plus élevés que la dose journalière recommandée risquent de perturber l'analyse. Par conséquent, il est capital d'informer les professionnels de santé et les patients de l'absorption de biotine au moment de prélever les échantillons afin d'éviter toute erreur dans les résultats d'analyse. Les résultats montrent que la concentration la plus élevée à laquelle aucune interférence significative n'a été observée est de 5 ng/mL de biotine D.

Les échantillons de patients régulièrement exposés à des produits d'origine animale ou à base de sérums animaux peuvent contenir des anticorps hétérophiles qui réagissent avec les anticorps des réactifs, ce qui risque d'entraîner des résultats faussement élevés. Ce dosage a été formulé pour atténuer le risque de ce type d'interférence. Cependant, des interactions potentielles peuvent survenir entre les sérums de patients et les éléments de test.

13 VALEURS ATTENDUES

Les niveaux d'hormone parathyroïdienne intacte ont été mesurés chez cent quarante-huit (148) individus apparemment sains, aux États-Unis, avec le test PTH (Parathyroid) Intact ELISA.

Les valeurs obtenues se situaient entre 9,0 et 94 pg/mL pour le sérum.

Selon les tests statistiques sur l'asymétrie et l'aplatissement, la population dont les données sont exprimées sous forme de logarithmes suit la distribution normale ou courbe de Gauss.

Les écarts-types géométriques ± 2 de la moyenne devraient se situer entre 10,4 et 66,5 pg/mL pour le sérum.

14 CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

14.1 Traçabilité

Les étalons de PTH (Parathyroid) Intact ELISA sont conformes au recombinant NIBSC 95/646 de la PTH (1 à 84) de la norme internationale de l'OMS.

1,0 pg/mL = 1,07 pg/mL NIBSC 95/646

14.2 Précision

Trois cent neuf (309) échantillons de patients dont les valeurs de PTH (Parathyroid) Intact ELISA varient de 1,0 à 833 pg/mL ont été testés avec la trousse PTH précédente de DRG et la trousse PTH mise à jour de DRG.

L'analyse de régression linéaire donne les statistiques suivantes :

DRG ELISA = 1,06 la trousse ELISA - 1,49 pg/mL	r = 0,998	N = 309
--	-----------	---------

14.3 Sensibilité

La sensibilité (ou limite minimale de détection) de ce dosage est définie comme la valeur la plus basse pouvant être distinguée de zéro à la limite de confiance de 95 %.

La sensibilité du test PTH (Parathyroid) Intact ELISA est de 1,57 pg/mL, selon les calculs.

14.4 Spécificité et réactivité croisée

Les anticorps utilisés dans le test PTH (Parathyroid) Intact ELISA ont été purifiés par chromatographie d'affinité afin de pouvoir être appliqués spécifiquement à des régions bien définies de la molécule de PTH. L'anticorps marqué à la peroxydase ne reconnaît que la région N-terminal ou la séquence d'acides aminés 1 à 34 de la molécule de PTH tandis que l'anticorps biotinylé est spécifique au segment 39 à 84. En conséquence, seule la PTH intacte qui nécessite une liaison par les deux anticorps à la fois, celui conjugué à l'enzyme et celui biotinylé, peut être détectée par ce dosage.

La conjugaison, la biotinylation et les rapports molaires mentionnés précédemment ont été optimisés de façon à minimiser la détection des fragments de PTH et à affiner la spécificité de ce dosage. La séquence 1 à 34 de la PTH humaine aux niveaux ne dépassant pas 300 pg/mL et le fragment 39 à 84 de C-terminal aux niveaux non au-delà de 300 000 pg/mL produisent des réactivités croisées molaires anti-PTH inférieures à 2 % et 0,02 % respectivement.

La séquence 7 à 84 de la PTH humaine à un niveau ne dépassant pas 1 000 pg/mL a montré une réactivité croisée de 44,5 %.

14.5 Précision et reproductibilité

La précision (variation intra-essai) du test PTH (Parathyroid) Intact ELISA a été calculée à partir de 25 dosages réitérés sur chacun des deux échantillons.

Variation intra-essai

Échantillon	Valeur moyenne (pg/mL)	N	Coefficient de variation %
A	32,4	25	6,08
B	178,2	25	3,68

La précision totale (variation intra-essai) du test PTH (Parathyroid) Intact ELISA a été calculée à partir de données de deux échantillons, obtenues après 21 dosages effectués par trois techniciens sur trois lots différents de réactifs.

Variation inter-essai

Échantillon	Valeur moyenne (pg/mL)	N	Coefficient de variation %
A	30,3	21	3,6
B	159,1	21	2,8

14.6 Récupération

On a ajouté des volumes différents de PTH 1 à 84 à trois sérums de patients différents pour déterminer la récupération. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Échantillon de sérum	PTH endogène (pg/mL)	PTH ajoutée (pg/mL)	Valeur attendue (pg/mL)	Valeur mesurée (pg/mL)	Récupération (%)
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 %

Moyenne 103 %

14.7 Linéarité des dilutions des échantillons de patients : Parallélisme

Quatre échantillons de sérum de patients ont été dilués avec du Réactif 3 (le diluant pour les échantillons de patients lus hors des limites). Les résultats en pg/mL sont indiqués ci-après :



Échantillon	Dilution	Valeur attendue	Valeur observée	% observé ÷ attendu
A	Non dilué	-	322	-
	1:2	161	148	92 %
	1:4	80,5	73,1	91 %
	1:8	40,3	41,5	103 %
B	Non dilué	-	230	-
	1:2	115	97	84 %
	1:4	58	55	95 %
	1:8	29	30	103 %
C	Non dilué	-	176	-
	1:2	88	82	93 %
	1:4	44	45	102 %
	1:8	22	24	109 %
D	Non dilué	-	426	-
	1:2	213	192	90 %
	1:4	107	90	84 %
	1:8	53	47	89 %

Moyenne 95 %

15 REFERENCES / LITERATURE

1. Segre, G.V., Niall H.D., Habener J.F. et. al.: Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance. *Am. J. Med.* 56: 774,1974.
2. Mallette, L.E., Gagel, R.F.: Parathyroid Hormone and Calcitonin. In: Murray J.F. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 65-69, 1990.
3. Bilezikian, J.P.: Primary Hyperparathyroidism. In: Murray J.F. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 109-111, 1990.
4. Stewart, A.F.: Humoral Hypercalcemia of Malignancy. In: Murray J.F. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 115-118, 1990.
5. Mallette, L.E.: The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action. *Endocrin. Rev.* 12:110-117, 1991.
6. Kruger, L., Rosenblum, S., Zaazra, J. and Wong, J. Intact PTH is stable in unfrozen EDTA plasma for 48 hours prior to laboratory Analysis. *Clin. Chem.* 41:6: page S47, 1995.
7. Raisz, L.G., Yajnik, C.H., Bockman, R.S., and Bower, B.B.: Comparison of commercially available parathyroid hormone immunoassay in the differential diagnosis of hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism or malignancy. *Ann. Intern. Med.* 91:739-740, 1979.
8. Endres, D., Brickman, A., Goodman, W., Maloney, D., and Sherrard, D.: N-Terminal PTH radioimmunoassays in assessment of renal osteodystrophy. *Kidney International.* 21:132, 1982.
9. Dambacher, M.A., Fischer, J.A., Hunziker, W.H., et.al.: Distribution of circulating immunoreactive components of parathyroid hormone in normal subjects and in patients with primary and secondary hyperparathyroidism: the role of kidney and of the serum calcium concentration., *Clin. Sci.* 57:435,1979.
10. Kao, P.C., Jiang, N.S., Klee, G.G., and Purnell, D.C.: Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH)., *Clin. Chem.* 28:69, 1982.
11. Endres, D.B., Villanueva, R., Sharp, C.F. Jr, Singer, F.R.: Measurement of parathyroid hormone., *Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 18:611-629,1989.
12. Kao, P.C., van Heerden, J.A., Grant, C.S., Klee, G.G., Khosla S: Clinical performance of parathyroid hormone immunometric assays., *Mayo Clin. Proc.* 67:637-645, 1992.
13. Marcus, R.: Laboratory diagnosis of primary hyperparathyroidism., *Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 18:647-658, 1989.
14. Schiettecatte, J., Anckaert, E. and Smits, J. (2012): Interferences in Immunoassays. N.H.L. Chiu, Ed. *Advances in Immunoassay Technology*, pp. 1-62.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité