



hPTH-ELISA

KAP1481

Read entire protocol before use.

hPTH-ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of human Intact Parathyroid Hormone (PTH) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource hPTH-ELISA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1481 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Human parathyroid hormone (hPTH) is a major physiological regulator of phosphocalcic metabolism. hPTH increases serum calcium concentrations by its actions on kidney (enhancing tubular Ca^{++} reabsorption and phosphate excretion) and bone (stimulating osteoclastic activity and bone resorption). It indirectly affects intestinal absorption of Ca^{++} by stimulating renal 1α -hydroxylation of 25 hydroxyvitamin D. The release of PTH is controlled in a negative feedback loop by the serum concentration of Ca^{++} .

PTH is synthesized in the chief cells of the parathyroid glands and secreted as an 84 amino acid molecule called "intact PTH", which is the main bioactive product. This molecule is degraded by proteolytic cleavage between amino acids 33-37 at peripheral sites to form biologically active amino-terminal fragments and biologically inactive carboxyl-terminal fragments. The carboxyl-terminal fragments are cleared only by glomerular filtration, while the bioactive intact PTH and amino-terminal fragments are also metabolically degraded in the liver and other tissues. The half-life of the carboxyl-terminal fragments increases dramatically in patients with renal failure. Thus, the measurement of intact PTH correlates best with the hormone production and biological activity.

B. Clinical application

The measurement of intact hPTH is used to establish the diagnosis of primary hyperparathyroidism by demonstrating elevated serum levels of bioactive PTH. It allows documenting the occurrence of secondary hyperparathyroidism in patients with Vit.D deficiency, intestinal malabsorption, or renal failure. In this last situation, the absence of interference with the inactive carboxyl-terminal fragments is especially valuable. The specificity and high sensitivity of the assay also allows differentiating clearly low serum PTH levels in hypoparathyroidism or in tumor-induced hypercalcaemia.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIIAsource hPTH-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplates. Calibrators and samples react with the capture polyclonal antibodies (PAb, goat anti 1-34 PTH fragment) coated on microtiter well. After incubation, the excess of antigen is removed by washing. Then monoclonal antibodies (MAB, mouse anti 44-68 PTH fragment) labelled with horseradish peroxidase (HRP) are added. After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated PABs – human PTH – MAB – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. The chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the PTH concentration.

A calibration curve is plotted and PTH concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the ELISA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti PTH (polyclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use
Ab HRP Conjugate: HRP labelled anti-PTH (monoclonal antibodies) in TRIS-maleate buffer with bovine serum albumin, thymol and sheep serum	1 vial 11 ml	red	Ready for use
CAL 0 Zero calibrator in human plasma and thymol	1 vial lyophilized	yellow	Add 3.0 ml distilled water
CAL N Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma and thymol	5 vials lyophilized	yellow	Add 1.0 ml distilled water
WASH SOLN CONC Wash Solution (NaCl-Tween20)	1 vials 25 ml	green	Dilute 28 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophilized	silver	Add 1.0 ml distilled water
INC BUF Incubation Buffer with EDTA, Benzamidin and azide (< 0.1%)	1 vial 6 ml	blue	Ready for use
CHROM TMB Chromogenic Solution (TMB : Tetramethylbenzidine)	1 vial 25 ml	white	Ready for use
STOP SOLN Stopping reagent: HCl 1.0N	1 vial 25 ml	white	Ready for use

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 pg of a synthetic PTH (1-84) from the Japanese Peptide Institute.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
- Washer for microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)
- Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XI.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

A. Calibrators : Reconstitute the zero calibrator with 3.0 ml distilled water and other calibrators with 1 ml distilled water.

B. Controls : Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.

C. Working Wash solution : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 27 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (28x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls should be frozen immediately after use and kept at –20°C for 3 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Blood samples should be promptly separated from the blood cells.
- Serum and plasma must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 8 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- It is advisable to assay serum samples.
- Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

A. Handling notes
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of Incubation Buffer into all wells.
4. Pipette 200 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 4 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of anti-PTH-HRP conjugate into all the wells.
9. Incubate for 1 hour at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirate the liquid from each well.
11. Wash the plate 4 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
12. Pipette 100 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
13. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
14. Pipette 200 µl of Stop Solution into each well.
15. Read the absorbancies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

1. In this case, the ELISA-AID™ software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - $X_i = OD \text{ at } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = OD \text{ at } 490 \text{ nm}$
 - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A \cdot X - B$
 - If $X_i < 3 \text{ OD units}$, then $X \text{ calculated} = X_i$
 - If $X_i > 3 \text{ OD units}$, then $X \text{ calculated} = (Y_i - B)/A$
 - A 4 parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
 - The PTH concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

B. Bichromatic Reading

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of PTH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

hPTH-ELISA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml	0.050
	22 pg/ml	0.149
	70 pg/ml	0.344
	224 pg/ml	0.999
	666 pg/ml	2.721
	1400 pg/ml	4.483

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 2 pg/ml.

B. Specificity

Cross-reactive hormones or fragments were added to the zero calibrator, a high value calibrator (900 pg/ml) and a low value calibrator (100 pg/ml). The apparent PTH response was measured.

Cross-reactant	No significant interference up to
PTH 1-34 synthetic fragment, human	1000 pg/ml
PTH 44-68 synthetic fragment, human	20000 pg/ml
PTH 53-84 synthetic fragment, human	20000 pg/ml
PTH 73-84 synthetic fragment, human	100000 pg/ml
PTH-related protein 1-34 synthetic fragment, human	100000 pg/ml

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	41.0 ± 0.5	1.1	A	20	45.7 ± 3.3	7.1
B	10	594 ± 12	2.0	B	20	381 ± 11.1	2.9

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added PTH (pg/ml)	Recovered PTH (pg/ml)	Recovery (%)
Serum	371	333	90
Heparin plasma	371	347	93
EDTA plasma	371	350	94

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
Serum	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 60 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

TIME DELAY					
	T0	15 min	30 min	45 min	60 min
S1	158	146	166	144	137
S2	77	72	70	67	72
S3	328	320	323	342	357
S4	260	250	250	258	251

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

	N	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
Normal patients	156	29	16 - 46
Hyperparathyroidism	64	291	106 - > 1000
Hypoparathyroidism	11	0	0 – 6.4

The range is based on 5% to 95% percentiles.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS**Safety**

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl, the chromogen contains TMB. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. HABENER J.F., and POTTE J.T., Jr. (1978) **"Biosynthesis of parathyroid hormone"**. New Engl. J. Med., 299, 11:580 and 299, 12:635.
2. MARTIN K.J., HRUSKA K.A., FREITAG J.J., KLAH S. and SLOPOLSKY E. (1979) **"The peripheral metabolism of parathyroid hormone"**. New Engl. J. Med., 301, 20:1092.
3. GOLTZMAN D., HENDERSON B. and LOVERIDGE N. "Cytochemical bioassay of PTH. (1980) **Characteristics of the assay and analysis of circulating hormone forms"**. J. Clin. Invest., 65:1309.
4. POTTS J.T. Jr., KRONENBERG H.M., ROSENBLATT M. (1982) **"Parathyroid hormone : Chemistry, biosynthesis and mode of action"**. Adv. Protein Chem., 323.
5. HACKENG W.H.L., LIPS P., NETELENBOS J.C. and LIPS C.J.M. (1986) **"Clinical implication of estimation of intact parathyroid hormone (PTH) versus total immunoreactive PTH in normal subjects and hyperparathyroid patients"**. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63:447.
6. BOUILLON R., COOPMANS W., DE GROOTE D.E.H., RADOUX D., ELIARD P.H. (1990) **"Immunoradiometric assay of Parathyrin with polyclonal and monoclonal region specific antibodies"**. Clin. Chem., 36/2:271-276.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Incubation buffer Calibrators (0-5) Samples, Controls	50 200 -	50 - 200
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 4 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Anti-PTH-HRP	100	100
Incubate for 1 hour at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 4 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 30 min at room temperature with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	200	200
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm) and 490 nm (versus 630 or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1481	P.I. Number : 1700499/en	Revision nr : 161123/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2016-11-23

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hPTH-ELISA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immunoenzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'Hormone Parathyroïdienne Humaine (PTH) dans le sérum et le plasma.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIASource hPTH-ELISA Kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1481 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

L'hormone parathyroïdienne humaine (hPTH) est un régulateur physiologique principal du métabolisme phosphocalcique. L'hPTH fait augmenter les concentrations de calcium dans le sérum par son effet sur les reins (améliorant la réabsorption tubulaire du Ca^{++} et l'excrétion de phosphate) et sur les os (stimulant l'activité ostéoclastique et la résorption osseuse). Indirectement, elle influence l'absorption intestinale du Ca^{++} en stimulant la 1α -hydroxylation rénale de la 25 hydroxyvitamine D. La libération de la PTH est contrôlée dans un rétrocontrôle négatif par la concentration de Ca^{++} dans le sérum.

La PTH est synthétisée dans les cellules principales de la glande parathyroïdienne et sécrétée comme une molécule de 84 acides aminés appelée "PTH intacte", qui est le produit bioactif principal. Cette molécule est dégradée par clivage protéolytique entre les acides aminés 33-37 à des sites périphériques afin de former des fragments amino-terminaux biologiquement actifs et des fragments carboxy-terminaux biologiquement inactifs. Les fragments carboxy-terminaux sont épurés par la seule filtration glomérulaire, tandis que la PTH intacte bioactive et les fragments amino-terminaux sont aussi dégradés métaboliquement dans le foie et d'autres tissus. La demi-vie des fragments carboxyl-terminaux augmente dramatiquement dans les patients qui souffrent d'une insuffisance rénale. Ainsi, la mesure de la PTH intacte correspond à la production hormonale et l'activité biologique.

B. Applications cliniques

La mesure de l'hPTH intacte est utilisée pour faire le diagnostic de l'hyperparathyroïdisme primaire en démontrant des taux en PTH bioactive élevés dans le sérum. Elle permet de documenter l'occurrence de l'hyperparathyroïdisme secondaire dans les patients qui souffrent d'une déficience Vit.D, d'une malabsorption intestinal, ou d'une insuffisance rénale. Dans ce cas-ci, surtout l'absence d'interférence avec les fragments carboxyl-terminaux est importante. La spécificité et la haute sensibilité de la trousse permettent aussi une distinction nette entre des taux en PTH bas dans le sérum en cas d'hypoparathyroïdisme ou en cas d'hypercalcémie induite par une tumeur.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La DIASource hPTH-ELISA est une « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectuée sur des micro-plaques. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec les anticorps de capture polyclonales (PAb, fragment anti 1-34 PTH de chèvre) recouverts sur un puits de microtitration. Après l'incubation, l'antigène superflu est enlevé par un lavage. Puis des anticorps monoclonaux (MAb, fragment anti 44-68 PTH de souris) marqués avec du peroxydase (HRP) sont ajoutés. Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich: PABs recouvert – PTH humaine – MAb – HRP, la micro-plaque est lavée afin d'enlever l'anticorps libre marqué enzymatiquement. L'anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la micro-plaque est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en PTH. Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en PTH dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration. L'utilisation du lecteur ELISA (linéarité jusque 3 unités OD) et une méthode de réduction de données sophistiquée (réduction de données polychromatique) résultent en une haute sensibilité dans la portée basse et en une portée de calibration étendue.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Micro-plaque de titration avec 96 puits recouvert d'anti PTH (anticorps polyclonaux)	96 wells	Blue	Prêt à l'emploi
Ab HRP Conjugué: anti-PTH marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonaux) dans un tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine, du thymol et du sérum de moutons	1 flacon 11 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
CAL 0 Calibrateur zéro dans du plasma humain et du thymol	1 flacon lyophilisés	Jaune	Ajouter 3,0 ml de l'eau distillée
CAL N Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain et du thymol	5 flacon lyophilisés	Jaune	Ajouter 1,0 ml de l'eau distillée
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tween 20-NaCl)	1 flacon 25 ml	Vert	Diluer 28x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	2 flacon lyophilisés	Gris	Ajouter 1,0 ml de l'eau distillée
INC BUF Tampon d'Incubation avec EDTA, de la benzamidine et de l' azide (< 0.1%)	1 flacon 6 ml	Blue	Prêt à l'emploi
CHROM TMB Solution Chromogénique (Tétraméthylbenzidine)	1 flacon 25 ml	Blanc	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt: HCl 1N	1 vial 25 ml	Blanc	Prêt à l'emploi

Note: 1. Utiliser le Calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 pg d'un PTH synthétique (1-84) de l'Institut de Peptide Japonais.

VI. MATERIEL NON FOURNI

- Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:
- Eau distillée
 - Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
 - Agitateur vortex
 - Agitateur magnétique
 - Agitateur de micro-plaques horizontal capable de 700 rpm ± 100 rpm
 - Laveur de micro-plaques
 - Lecteur de micro-plaques capable de lire à 450 nm, 490 nm et 650 nm (en cas de lecture polychromatique) ou capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture monochromatique)
 - Équipement supplémentaire: le ELISA-AID™ nécessaire à lire la plaque selon la lecture polychromatique (voir paragraphe XI.A.) peut être acheté chez Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 3 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 27 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (28x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un désiccant jusqu'à la date d'expiration.
- Après la reconstitution, les calibrateurs et les contrôles doivent être congelés immédiatement après l'usage et gardés à -20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sang doivent être séparés immédiatement des cellules sanguines.
- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 8 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être à température ambiante. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- Il est recommandé de tester les échantillons de sérum.
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés

X. MODE OPERATOIRE

- A. **Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.
Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
Utiliser un récipient en plastic propre pour préparer la Solution de Lavage. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Pour la distribution de la Solution Chromogénique et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.
Respecter les temps d'incubation.
Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai mentionné dans la section XIII paragraphe E (délai).
Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
Distribuer la Solution Chromogénique dans les 15 minutes après le lavage de la micro-plaque de titration.
Eviter exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la Solution Chromogénique.

B. Mode opératoire

1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un desiccant et gardées à 2-8°C.
2. Placer les barrettes dans le support.
3. Pipeter 50 µl du tampon d'incubation dans tous les puits.
4. Pipeter 200 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
5. Incuber pendant 2 heures à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirer le liquide de chaque puits.
7. Laver la plaque 4 fois en:
 - distribuant 0,4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - aspirant le contenu de chaque puits
8. Pipeter 100 µl du conjugué anti-PTH-HRP dans tous les puits.
9. Incuber pendant 1 heure à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirer le liquide de chaque puits.
11. Laver la plaque 4 fois en:
 - distribuant 0,4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - aspirant le contenu de chaque puits
12. Pipeter 100 µl de la Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
13. Incuber la micro-plaque pendant 30 minutes à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm, éviter exposition à la lumière du soleil.
14. Pipeter 200 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
15. Lire les absorbances à 450 nm et 490 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) dans 1 heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RESULTATS

A. Lecture polychromatique:

1. En ce cas, le software ELISA-AID™ fera le traitement des données.
2. La plaque est lue d'abord à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
3. Une seconde lecture est effectuée à 490 nm contre le même filtre de référence.
4. Le software ELISA-AID™ manœuvrera le lecteur automatiquement et intégrera les deux lectures dans un modèle polychromatique. Cette technique peut générer des OD's jusqu'à 10.
5. Le principe du traitement de données polychromatique est le suivant:
 - $X_i = OD \text{ à } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = OD \text{ à } 490 \text{ nm}$
 - Utilisant une régression linéaire non pondérée standard, les paramètres A & B sont calculés : $Y = A * X - B$
 - Si $X_i < 3$ unités OD, X calculé = X_i
 - Si $X_i > 3$ unités OD, X calculé = $(Y_i - B) / A$
 - Un lissage de courbes « 4 paramètres » est utilisé pour la courbe de calibration.
 - La concentration en PTH des échantillons est déterminée par interpolation sur la courbe de calibration.

B. Lecture bichromatique

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les DO (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en PTH (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
5. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

hPTH-ELISA		Unités OD modèle polychromatique
Calibrateur	0 pg/ml	0,050
	22 pg/ml	0,149
	70 pg/ml	0,344
	224 pg/ml	0,999
	666 pg/ml	2,721
	1400 pg/ml	4,483

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 2 pg/ml.

B. Spécificité

Des hormones ou des fragments cross-réactifs ont été ajoutés au calibrateur zéro, à un calibrateur à valeur haute (900 pg/ml) et à un calibrateur à valeur basse (100 pg/ml). La réponse PTH a été mesurée.

Cross-réactif	Pas d'interférence significative jusqu'à
Fragment synthétique PTH 1-34, humain	1000 pg/ml
Fragment synthétique PTH 44-68, humain	20000 pg/ml
Fragment synthétique PTH 53-84, humain	20000 pg/ml
Fragment synthétique PTH 73-84, humain	100000 pg/ml
Fragment synthétique 1-34 de protéine relative à la PTH, humain	100000 pg/ml

C. Précision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	41,0 ± 0,5	1,1	A	20	45,7 ± 3,3	7,1
B	10	594 ± 12	2,0	B	20	381 ± 11,1	2,9

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	PTH ajoutée (pg/ml)	PTH récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
Sérum	371	333	90
Plasma hépariné	371	347	93
Plasma EDTA	371	350	94

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
Sérum	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 60 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux puits avec l'anticorps.

DELAÏ					
	T0	15 min	30 min	45 min	60 min
S1	158	146	166	144	137
S2	77	72	70	67	72
S3	328	320	323	342	357
S4	260	250	250	258	251

XIV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Les contrôles qui contiennent de l'azide interféreront avec la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

	N	Médiane (pg/ml)	Portée (pg/ml)
Patients normaux	156	29	16 - 46
Hyperparathyroïdisme	64	291	106 - > 1000
Hypoparathyroïdisme	11	0	0 – 6,4

La portée est basée sur des percentiles de 5% à 95%.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Eviter le contact de la peau avec tous les réactifs. La Solution d'arrêt contient de l'HCl, la Solution Chromogénique contient de la TMB. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. HABENER J.F., and POTTE J.T., Jr. (1978)
"Biosynthesis of parathyroid hormone".
New Engl. J. Med., 299, 11:580 and 299, 12:635.

2. MARTIN K.J., HRUSKA K.A., FREITAG J.J., KLAH S. and SLOTOPOLSKY E. (1979)
"The peripheral metabolism of parathyroid hormone".
New Engl. J. Med., 301, 20:1092.

3. GOLTZMAN D., HENDERSON B. and LOVERIDGE N. "Cytochemical bioassay of PTH. (1980)
Characteristics of the assay and analysis of circulating hormone forms".
J. Clin. Invest., 65:1309.

4. POTTS J.T. Jr., KRONENBERG H.M., ROSENBLATT M. (1982)
"Parathyroid hormone : Chemistry, biosynthesis and mode of action".
Adv. Protein Chem., 323.

5. HACKENG W.H.L., LIPS P., NETELENBOS J.C. and LIPS C.J.M. (1986)
"Clinical implication of estimation of intact parathyroid hormone (PTH) versus total immunoreactive PTH in normal subjects and hyperparathyroid patients".
J. Clin. Endocrinol. Metab., 63:447.

6. BOUILLON R., COOPMANS W., DE GROOTE D.E.H., RADOUX D., ELIARD P.H. (1990)
"Immunoradiometric assay of Parathyrin with polyclonal and monoclonal region specific antibodies".
Clin. Chem., 36/2:271-276.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	CALIBRA-TEURS (ml)	ECHANTIL-LON(S) CONTROLES (ml)
Tampon d'Incubation Calibrateurs (0-5) Echantillons, Contrôles	50 200 -	50 - 200
Incuber pendant 2 heures à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 4 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Anti-PTH-HRP	100	100
Incuber pendant 1 heure à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 4 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution Chromogénique	100	100
Incuber pendant 30 min à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm.		
Solution d'arrêt	200	200
Lire sur un lecteur de micro-plaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm) et 490 nm (contre 630 ou 650 nm)		

Numéro de catalogue DIASource: KAP1481	Numéro de P.I.: 1700499/fr	Numéro de révision : 161123/1
--	----------------------------	-------------------------------

Date de révision : 2016-11-23

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hPTH-ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem intaktem Parathormon (PTH) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource hPTH-ELISA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1481 : 96 tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivitäten

Humanes Parathormon (hPTH) ist ein wichtiger physiologischer Regulator des Phosphor- und Calciumstoffwechsels. hPTH erhöht die Serumcalciumkonzentrationen durch seine Wirkung auf Niere (Verstärkung der tubularen Ca^{++} Reabsorption und der Phosphatexkretion) und Knochen (Stimulierung der osteoklastischen Aktivität und Knochenresorption). Durch die Stimulierung der 1α -Hydroxylation von 25 Hydroxyvitamin D wirkt es indirekt auf die Ca^{++} Absorption im Darm. Die Freigabe von PTH wird in einer negativen Rückkopplung durch die Serumkonzentration von Ca^{++} kontrolliert.

PTH wird in den Nebenschilddrüsen synthetisiert und als ein 84 Aminosäurenmolekül namens 'intaktes PTH' sezerniert, was das wichtigste bioaktive Produkt ist. Dieses Molekül wird durch proteolytische Spaltung zwischen Aminosäuren 33-37 an peripheren Stellen gespalten, wodurch biologisch aktive aminoterminalen Fragmente und biologisch inaktive carboxyl-terminalen Fragmente entstehen. Die carboxyl-terminalen Fragmente werden nur durch Glomerulusfiltration geklärt, während das bioaktive intakte PTH und aminoterminalen Fragmente auch metabolisch in Leber und anderen Geweben abgebaut werden. Die Halbwertszeit der carboxyl-terminalen Fragmente steigt bei Patienten mit Nierenversagen dramatisch an. Daher korreliert die Messung von intaktem PTH am besten mit der Produktion und biologischen Aktivität des Hormons.

B. Klinische Anwendung

Die Messung von intaktem hPTH wird zur Diagnostizierung eines primären Hyperparathyreoidismus eingesetzt, indem erhöhte Serumwerte von bioaktivem PTH nachgewiesen werden. Sie ermöglicht den Nachweis des Vorliegens eines sekundären Hyperparathyreoidismus bei Patienten mit Vitamin-D Mangel, intestinaler Malabsorption oder Nierenversagen. In diesem letzten Fall ist vor allem das Fehlen einer Interferenz mit den inaktiven carboxyl-terminalen Fragmenten wertvoll. Die Spezifität und hohe Sensibilität des Assay erlaubt auch eine deutliche Unterscheidung zwischen niedrigen Serumwerten von PTH bei Hypoparathyreoidismus oder bei tumorinduzierter Hypercalcämie.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hPTH-ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem eingefangenen polyklonalen Antikörper (PAb, Ziege-anti 1-34 PTH-Fragment), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind. Nach einer Inkubationsphase werden überflüssige Antigene durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend werden monoklonale Antikörper (MAb, Maus-anti 44-68 PTH-Fragment), gekennzeichnet mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), hinzugegeben. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: PAk – Human PTH - MAk - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (gebrauchsfertiges TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur PTH-Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die PTH-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des ELISA-Lesegeräts (Lineartität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien		96 Test Kit	Farb-code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti PTH- beschichtete Wells (polyklonale Antikörper)		96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP Konjugat: MRP beschriftete Anti-PTH (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, Thymol und Schafserum		1 Gefäß 11 ml	Rot	gebrauchsfertig
CAL 0 Null Kalibrator in Humanplasma und Thymol		1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	3,0 ml dest. Wasser zugeben
CAL N Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma und Thymol		5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	1,0 ml dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC Waschlösung (NaCl-Tween20)		1 Gefäß 25 ml	Grün	28 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma und Thymol		2 Gefäße lyophilisiert	Silber	1,0 ml dest. Wasser zugeben
INC BUF Inkubationspuffer mit EDTA, Benzamidin und Azid (< 0,1%)		1 Gefäß 6 ml	Blau	gebrauchsfertig
CHROM TMB Farblösung TMB (Tetramethylbenzidin)		1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: HCL 1N		1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu zu 1 pg eines synthetischen PTH (1-84) vom Japanese Peptide Institute.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:
1. Hochwertiges destilliertes Wasser
 2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
 3. Vortex Mixer
 4. Magnetrührer
 5. Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm ± 100 rpm
 6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
 7. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (monochromatische Auswertung)
 8. Optional: ELISA-AID™ zur Auswertung der Platte nach polychromatischer Methode (siehe Abschnitt XI.A.), erhältlich bei Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 3,0 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- C. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (28x) mit 27 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden bis zum Verfallsdatum.
- Nach der Rekonstitution müssen Kalibratoren und Kontrollen sofort nach Verwendung eingefroren werden und können bei -20°C 3 Monate lang aufbewahrt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Blutproben müssen unverzüglich von den Blutzellen getrennt werden.
- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 8 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Es wird empfohlen, Assays an Serumproben durchzuführen.
- Keine hämolytischen Proben benutzen

X. DURCHFÜHRUNG

- A. Bemerkungen zur Durchführung**
- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der Farblösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
Pipettieren Sie die Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
Während der Inkubation mit der Farblösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

- Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
- Pipettieren Sie 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells.
- Pipettieren Sie jeweils 200 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte viermal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well;
 - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab.
- Pipettieren Sie jeweils 100 µl anti-PTH-HRP in die entsprechenden Wells.
- Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte viermal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well;
 - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab.
- Pipettieren Sie 100 µl der Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- Pipettieren Sie 200 µl des Stopplösung in jeden Well.
- Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt XI beschrieben.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung:

- In diesem Fall werden die Daten durch die ELISA-AID™ Software verarbeitet.
- Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
- Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
- Die ELISA-AID™ Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
- Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - Xi = OD bei 450 nm
 - Yi = OD bei 490 nm
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X - B$
 - Wenn $X_i < 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B)/A$
 - Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
 - Die PTH Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung:

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Kalibrator gegen die entsprechende PTH Konzentration (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.

- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

hPTH-ELISA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 pg/ml	0,050
	22 pg/ml	0,149
	70 pg/ml	0,344
	224 pg/ml	0,999
	666 pg/ml	2,721
	1400 pg/ml	4,483

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 2 pg/ml.

B. Spezifität

Kreuzreaktive Hormone oder Fragmente wurden dem Null-Kalibrator, einem Kalibrator mit hohem Wert (900 pg/ml) und einem Kalibrator mit niedrigem Wert (100 pg/ml) zugesetzt. Die auftretende PTH-Reaktion wurde gemessen.

Kreuzreaktant	keine signifikante Interferenz bis
PTH 1-34 humanes synthetisches Fragment	1000 pg/ml
PTH 44-68 humanes synthetisches Fragment	20000 pg/ml
PTH 53-84 humanes synthetisches Fragment	20000 pg/ml
PTH 73-84 humanes synthetisches Fragment	100000 pg/ml
PTH-ähnliches Protein 1-34 humanes synthet. Fragment	100000 pg/ml

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	41,0 ± 0,5	1,1	A	20	45,7 ± 3,3	7,1
B	10	594 ± 12	2,0	B	20	381 ± 11,1	2,9

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. PTH (pg/ml)	Wiedergef. PTH (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	371	333	90
Heparin Plasma	371	347	93
EDTA Plasma	371	350	94

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (pg/ml)	Gemess. Konz. (pg/ml)
Serum	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

E. **Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**
Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 60 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITDIFFERENCE					
	T0	15 min	30 min	45 min	60 min
S1	158	146	166	144	137
S2	77	72	70	67	72
S3	328	320	323	342	357
S4	260	250	250	258	251

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Azid enthaltende Kontrollen interferieren mit der enzymatischen Reaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

	N	Mittelwert (pg/ml)	Bereich (pg/ml)
Gesunde Patienten	156	29	16 - 46
Hyperparathyreoidismus	64	291	106 - > 1000
Hypoparathyreoidismus	11	0	0 – 6,4

Bereich ist auf Basis der 5% und 95% Perzentile.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit
Nur für diagnostische Zwecke.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.
Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält HCl, Farblösung enthält TMB. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.
Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

- HABENER J.F., and POTTE J.T., Jr. (1978) **"Biosynthesis of parathyroid hormone"**. New Engl. J. Med., 299, 11:580 and 299, 12:635.
- MARTIN K.J., HRUSKA K.A., FREITAG J.J., KLAH S. and SLOTOPOLSKY E. (1979) **"The peripheral metabolism of parathyroid hormone"**. New Engl. J. Med., 301, 20:1092.
- GOLTZMAN D., HENDERSON B. and LOVERIDGE N. "Cytochemical bioassay of PTH. (1980) **Characteristics of the assay and analysis of circulating hormone forms"**. J. Clin. Invest., 65:1309.
- POTTS J.T. Jr., KRONENBERG H.M., ROSENBLATT M. (1982) **"Parathyroid hormone : Chemistry, biosynthesis and mode of action"**. Adv. Protein Chem., 323.
- HACKENG W.H.L., LIPS P., NETELENBOS J.C. and LIPS C.J.M. (1986) **"Clinical implication of estimation of intact parathyroid hormone (PTH) versus total immunoreactive PTH in normal subjects and hyperparathyroid patients"**. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63:447.
- BOUILLON R., COOPMANS W., DE GROOTE D.E.H., RADOUX D., ELIARD P.H. (1990) **"Immunoradiometric assay of Parathyrin with polyclonal and monoclonal region specific antibodies"**. Clin. Chem., 36/2:271-276.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N) KONTROLLEN (µl)
Inkubationspuffer Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen	50 200 -	50 - 200
2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Viermal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Anti-PTH-HRP	100	100
1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Viermal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Farblösung	100	100
30 min. bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	200	200
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) und 490 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.		

DIAsource Katalognummer: KAP1481	Beipackzettelnummer: 1700499/de	Nummer der Originalausgabe 161123/1
-------------------------------------	------------------------------------	--

Revisionsdatum: 2016-11-23

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

hPTH-ELISA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'Ormone Paratiroideo Umano Intatto (PTH) in siero o plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource hPTH-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1481 : 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'ormone paratiroideo umano (PTH) è il principale regolatore fisiologico del metabolismo fosfocalcico. L'hPTH determina l'incremento delle concentrazioni sieriche di calcio attraverso i suoi meccanismi di azione che si svolgono a livello renale (aumento del riassorbimento tubulare di Ca^{++} e di escrezione di fosfati) e a livello osseo (stimolazione dell'attività osteoclastica e riassorbimento osseo). Tale ormone influisce indirettamente sull'assorbimento intestinale di Ca^{++} stimolando l'1 α -idrossilazione renale della 25-Idrossivitamina D. Il rilascio di PTH è controllato da un meccanismo di feedback negativo regolato dai livelli sierici di Ca^{++} .

Il PTH viene sintetizzato dalle cellule delle ghiandole paratiroidee e secreto sotto forma di una molecola composta da 84 aminoacidi, chiamata "PTH intatto", che rappresenta il principale prodotto bioattivo. La degradazione di tale molecola per clivaggio proteolitico tra gli aminoacidi 33-37 a livello dei siti periferici porta alla formazione di frammenti amino-terminali biologicamente attivi e di frammenti carbossi-terminali biologicamente inattivi. I frammenti carbossi-terminali vengono eliminati esclusivamente attraverso filtrazione glomerulare, mentre il PTH bioattivo intatto e i frammenti amino-terminali vengono metabolicamente degradati anche a livello epatico e di altri tessuti. L'emivita dei frammenti carbossi-terminali aumenta drasticamente nei pazienti con insufficienza renale. Pertanto, la misurazione del PTH intatto ben si correla con la produzione ormonale e l'attività biologica.

B. Applicazioni cliniche

La determinazione dei livelli di hPTH intatto trova impiego nella formulazione della diagnosi di iperparatiroidismo primario sulla base del riscontro di livelli sierici elevati di PTH attivo. Tale misurazione permette di verificare un iperparatiroidismo secondario in pazienti con deficienza di vitamina D, malassorbimento intestinale o insufficienza renale. In quest'ultima condizione, è particolarmente apprezzabile l'assenza di interferenza con i frammenti carbossi-terminali inattivi. La specificità e l'alta sensibilità del dosaggio consentono inoltre la chiara differenziazione tra riduzione dei livelli sierici di PTH associata a ipoparatiroidismo e a ipercalcemia tumore-indotta.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource hPTH-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. I calibratori e i campioni reagiscono con gli anticorpi policlonali di cattura (PAb, anti frammento 1-34 PTH di capra) coniugati, in pozzetti microtiter. Dopo incubazione, l'eccesso di antigene viene rimosso mediante lavaggio. Segue quindi l'aggiunta di anticorpi monoclonali (MAb, anti frammento 44-68 PTH di topo) marcati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo una fase di incubazione che permette la formazione di un sandwich: PABs - PTH umano – Mab – HRP, la piastra microtiter viene sottoposta a lavaggio per rimuovere la quota non legata di anticorpo marcato con enzima. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. La soluzione cromogenica (TMB pronta all'uso) viene aggiunta e incubata. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Stop Solution; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di PTH. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione PTH nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'impiego del lettore ELISA (linearità massima di 3 unità OD) e un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) determina una sensibilità elevata nell'intervallo inferiore e in un intervallo di calibrazione esteso.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti rivestiti anti PTH (anticorpi polyclonali)	96 pozzetti	blu	Pronto per l'uso
Ab HRP Coniugato: marcato HRP anti-PTH (Anticorpi monoclonali) in tampone TRIS- maleato con albumina di siero bovino, timolo e siero di pecora.	1 flacone 11 ml	rosso	Pronto per l'uso
CAL 0 Calibratore zero in plasma umano contenente timolo	1 flacone liofiliz.	giallo	Aggiungere 3,0 ml di acqua distillata
CAL N Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano contenente timolo	5 flaconi liofiliz.	giallo	Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (NaCl-Tween20)	1 flacone 25 ml	verde	Diluire 28 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano contenente timolo	2 vials lyophilized	argento	Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata
INC BUF Tampone per Incubazione con EDTA, benzamidina e azide (<0,1%)	1 flacone 6 ml	blu	Pronto per l'uso
CHROM TMB Soluzione Cromogena (TMB : tetrametilbenzidina)	1 flacone 25 ml	bianco	Pronto per l'uso
STOP SOLN Reagente di arresto: HCl 1.0N	1 flacone 25 ml	bianco	Pronto per l'uso

Note: 1. Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.
2. 1 pg della preparazione dei calibratori è equivalente a 1 pg di PTH sintetico (1-84) proveniente dal Japanese Peptide Institute

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata di qualità elevata
- Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Agitatore piastra di microtitolazione orizzontale capace di 700 rpm ± 100 rpm
- Lavatrice per piastra di microtitolazione
- Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm, 490 nm e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o con una potenza di 450 nm e 650 nm (lettura monocromatica)
- Apparecchiatura opzionale: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XIA.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

A. Calibratore: Ricostituire lo calibratore zero con 3.0 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 1 ml di acqua distillata.
B. Controlli: Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
C. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio: Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 27 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (28x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo ricostituzione, i calibratori e i controlli dovranno essere congelati immediatamente dopo l'uso e conservati a -20°C per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di sangue dovranno essere prontamente separati dalla componente cellulare.
- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 8 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- È consigliabile l'utilizzo di campioni di siero.
- Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale. Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. Per la distribuzione della Soluzione Cromogena e la Reagente di arresto evitare pipette con parti metalliche. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Per evitare il rischio di trascinamento, il tempo intercorrente tra pipettaggio del primo calibratore e ultimo campione deve essere limitato

sulla base dei valori riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso)

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

Distribuzione della Soluzione Cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la Soluzione Cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce Pipettare reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di Tampone per Incubazione nei pozzetti.
4. Pipettare 200 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente su di un agitatore orizzontale regolato a 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 4 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipette 100 µl di coniugato anti-PTH-HRP nei pozzetti.
9. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente su di un agitatore orizzontale regolato a 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra 4 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
12. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio
13. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente su di un agitatore orizzontale regolato a 700 rpm ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
14. Pipettare 200 µl di Reagente di Arresto in ogni pozzetto.
15. Leggere le assorbanze a 450 nm e 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 1 ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

1. In questo caso il software ELISA-AID™ si occupa dell'elaborazione dati.
2. La piastra viene prima letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento
3. Una seconda lettura viene effettuata a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. IL software ELISA-AID™ Software comanderà automaticamente il lettore ed integrerà entrambe le letture in un modello policromatico. Questa tecnica può genera OD fino ad un massimo di 10.
5. Qui di seguito è illustrata l'elaborazione policromatica dei dati:
 - $X_i = OD \text{ a } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = OD \text{ a } 490 \text{ nm}$
 - Utilizzando una regressione lineare non ponderata, vengono calcolati i parametri A e B. $Y = A \cdot X - B$
 - Se $X_i < 3$ unità OD, allora X calcolato = X_i
 - Se $X_i < 3$ unità OD, allora X calcolato = $(Y_i - B)/A$
 - Uno schema con curva logistica a 4 parametri viene utilizzato per costruire la curva di calibrazione.
 - La concentrazione di PTH nei campioni viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

B. Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di PTH., collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati qui di seguito riportati sono ad esclusivo scopo illustrativo e non devono mai essere utilizzati in sostituzione della curva di calibrazione ottenuta in tempo reale.

hPTH-ELISA		Unità OD modello Policromatico
Calibratore	0 pg/ml	0,050
	22 pg/ml	0,149
	70 pg/ml	0,344
	224 pg/ml	0,999
	666 pg/ml	2,721
	1400 pg/ml	4,483

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello calibratore zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 2 pg/ml.

B. Specificità

Sono stati aggiunti ormoni o frammenti cross-reagenti al Calibratore Zero, a un calibratore di livello elevato (900 pg/ml) e a un calibratore di basso livello (100 pg/ml). È stata quindi valutata la risposta di PTH apparente.

Cross-reagenti	Nessuna interferenza significativa fino a
Frammento 1-34 PTH sintetico, umano	1000 pg/ml
Frammento 44-68 PTH sintetico, umano	20000 pg/ml
Frammento 53-84 PTH sintetico, umano	20000 pg/ml
Frammento 73-84 PTH sintetico, umano	100000 pg/ml
Frammento 1-34 Peptide legato al PTH sintetico, umano	100000 pg/ml

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	41,0 ± 0,5	1,1	A	20	45,7 ± 3,3	7,1
B	10	594 ± 12	2,0	B	20	381 ± 11,1	2,9

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	PTH aggiunta (pg/ml)	PTH recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
Siero	371	333	90
Plasma eparinato	371	347	93
Plasma EDTA	371	350	94

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
Serum	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione
 Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 60minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO					
	T0	15 min	30 min	45 min	60 min
S1	158	146	166	144	137
S2	77	72	70	67	72
S3	328	320	323	342	357
S4	260	250	250	258	251

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Controlli contenenti azide interferiscono con la reazione enzimatica e non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

I valori qui di seguito riportati sono da considerare come valori guida; ciascun laboratorio dovrà stabilire il proprio range di normalità.

	N	Mediana (pg/ml)	Range (pg/ml)
Pazienti normali	156	29	16 - 46
Iperparatiroidismo	64	291	106 - > 1000
Ipoparatiroidismo	11	0	0 – 6,4

Il range è basato sui percentili 5%-95%.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
 Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
 I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
 Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
 Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti. La Reagente di Arresto contiene HCl, il cromogeno contiene TMB in dimetilformamide, il tampone substrato contiene H₂O₂. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
 Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- HABENER J.F., and POTTE J.T., Jr. (1978) **"Biosynthesis of parathyroid hormone"**. New Engl. J. Med., 299, 11:580 and 299, 12:635.
- MARTIN K.J., HRUSKA K.A., FREITAG J.J., KLAH S. and SLOTOPOLSKY E. (1979) **"The peripheral metabolism of parathyroid hormone"**. New Engl. J. Med., 301, 20:1092.
- GOLTZMAN D., HENDERSON B. and LOVERIDGE N. "Cytochemical bioassay of PTH. (1980) **Characteristics of the assay and analysis of circulating hormone forms"**. J. Clin. Invest., 65:1309.
- POTTS J.T. Jr., KRONENBERG H.M., ROSENBLATT M. (1982) **"Parathyroid hormone : Chemistry, biosynthesis and mode of action"**. Adv. Protein Chem., 323.
- HACKENG W.H.L., LIPS P., NETELENBOS J.C. and LIPS C.J.M. (1986) **"Clinical implication of estimation of intact parathyroid hormone (PTH) versus total immunoreactive PTH in normal subjects and hyperparathyroid patients"**. J. Clin. Endocrinol. Metab., 63:447.
- BOUILLON R., COOPMANS W., DE GROOTE D.E.H., RADOUX D., ELIARD P.H. (1990) **"Immunoradiometric assay of Parathyrin with polyclonal and monoclonal region specific antibodies"**. Clin. Chem., 36/2:271-276.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Tampone per Incubazione Calibratore (0-5) Campioni, controlli	50 200 -	50 - 200
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 4 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Anti-PTH-HRP	100	100
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 4 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione Cromogena	100	100
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione a 700 rpm.		
Reagente di Arresto	200	200
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm) e 490 nm (rispetto a 630 o 650 nm)		

Numero di catalogo di DIAsource: KAP1481	P.I. Numero : 1700499/it	Revisione numero: 161123/1
--	-----------------------------	-------------------------------

Leer el protocolo completo antes de usar.

hPTH-ELISA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in vitro de la Hormona Paratiroidea intacta (PTH) humana en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource hPTH-ELISA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KAP1481 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades Biológicas

La hormona paratiroidea humana (hPTH) es un regulador fisiológico importante del metabolismo fosfocálcico. La hPTH aumenta las concentraciones del calcio en suero por su influencia sobre el riñón (mejora la reabsorción tubular del Ca^{++} y la excreción fosfática) y el hueso (estimula la actividad osteoclástica y la resorción ósea). Influencia indirectamente la absorción intestinal del Ca^{++} porque estimula la 1α -hidroxilación renal de la 25 hidroxivitamina D. La liberación de la PTH es controlada por un sistema de feedback negativo por la concentración del Ca^{++} en suero.

La PTH es sintetizada en las células principales de las glándulas paratiroides y secretada como una molécula con 84 aminoácidos que se llama "PTH intacta", el producto bioactivo principal. Esta molécula es degradada por una escisión proteolítica entre los aminoácidos 33-37 a sitios periféricos para formar fragmentos amino-terminales biológicamente activos y fragmentos carboxilo-terminales biológicamente inactivos. Los fragmentos carboxilo-terminales son purificados solamente por filtración glomerular, mientras que la PTH intacta bioactive y los fragmentos amino-terminales son degradados metabólicamente en el hígado y otros tejidos también. La media vida de los fragmentos carboxilo-terminales aumenta enormemente en pacientes con una falla renal. Así la medición de la PTH intacta corresponde mayor con la producción hormonal y la actividad biológica.

B. Aplicación clínica

La medición de la hPTH intacta es utilizada para el diagnóstico del hiperparatiroidismo primario por la demostración de niveles elevados de PTH bioactiva en suero. Permite la documentación de la aparición del hiperparatiroidismo secundario en pacientes con una deficiencia de Vit.D, malabsorción intestinal, o falla renal. En esta última situación, la ausencia de interferencia con los fragmentos carboxilo-terminales inactivos es muy importante. La especificidad y la sensibilidad elevada del ensayo permite una diferenciación clara entre niveles de PTH en suero bajos en hipoparatiroidismo o en hipercalcemia inducida por un tumor.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIAsource hPTH-ELISA es un “Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay” a fase sólida efectuada con placas de microvaloración. Los calibradores y las muestras reaccionan con los anticuerpos de captura policlonales (PAb, fragmento anti 1-34 PTH de cabra) recubiertos en un pocillo de microvaloración. Después de la incubación, el exceso de antígeno es quitado por una fase de lavamiento. Después, anticuerpos monoclonales (MAb, fragmento anti 44-68 PTH de ratón) marcados con la peroxidasa de rábano picante (HRP) son añadidos. Después de una fase de incubación que permite la formación de un sandwich: PABs recubierto – PTH humana – MAb – HRP, la placa de microvaloración es lavada para quitar los anticuerpos maracados con enzimas libres. Los anticuerpos marcados con enzimas ligados se miden con una reacción cromógena. La solución cromógena (TMB listo para el uso) es añadida y incubada. La reacción se para con la adición de la Solución de Parada y la placa de microvaloración se lee en la longitud de onda apropiada. La cantidad de recambio de sustrato es determinada de manera colorimétrica por la medición de la absorbancia, que es proporcional a la concentración de PTH.

Una curva de calibración es elaborada y la concentración de PTH en las muestras es determinada por interpolación de la curva de calibración. El uso del lector ELISA (linealidad hasta 3 unidades OD) y de un método de reducción de datos sofisticado (reducción de datos policromática) resulta en una sensibilidad elevada en el alcance bajo y en un alcance de calibración extenso.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución
 Placa de microvaloración con 96 pocillos recubiertos anti PTH (anticuerpos policlonales)	96 pocillos	azul	Listo para uso
Ab HRP Conjugado: anti-PTH marcada con HRP (anticuerpos monoclonales) en tampón TRIS con albúmina bovina, thymol y suero ovino	1 vial 11 ml	rojo	Listo para uso
CAL 0 Calibrador cero en plasma humana y thymol	1 vial líoofilizados	amarillo	Añadir 3 ml de agua destilada
CAL N Calibradores N = 1 a 5 en plasma humana y thymol (mirar los valores exactos en las etiquetas)	5 viales líoofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tween 20- NaCl)	1 vial 25 ml	Verde	Diluir 28 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y thymol.	2 viales líoofilizados	plateado	Añadir 1 ml de agua destilada
INC BUF Tampón de Incubación con EDTA, Benzamidina y azida (< 0.1%)	1 vial 6 ml	Azul	Listo para uso
CHROM TMB Solución Cromógena TMB (Tetrametilbenzidina)	1 vial 25 ml	blanco	Listo para uso
STOP SOLN Solución de Parada: HCl 1N	1 vial 25 ml	blanco	Listo para uso

Nota: 1. Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 1 pg de una PTH sintética (1-84) del Instituto de Péptidos Japonés (Japanes Peptide Institute).

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada

2. Pipetas de 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas de microvaloración horizontal capaz de 700 rpm ± 100 rpm
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvloración capaz de leer a 450 nm, 490 nm y 650 nm (en caso de lectura policromática) o capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura monocromática)
8. Material opcional: el ELISA-AID™ necesario para leer la placa con la lectura policromática (vease párrafo XI.A.) puede ser comprado a Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3 ml de agua destilada y otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 27 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (28x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Las tiras sin usar deben ser guardadas a 2-8°C, en un saco sellado con un desicante hasta la fecha de caducidad.
- Después de la reconstitución, los calibradores y los controles deben ser congelados inmediatamente después del uso y guardadas a –20°C durante 3 meses a lo más. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de Lavamiento concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de sangre deben ser separadas inmediatamente de la células sanguíneas.
- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2 – 8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 8hrs., almacenar las muestras a –20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Antes del uso cada muestra debe ser a temperatura ambiente. Vortexar cada muestra antes del uso.
- Se recomienda probar las muestras de suero.
- No utilizar muestras hemolizadas.

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
- No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Efectuar los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda una alineación vertical. Utilizar un recipiente de plástico limpio para preparar la Solución de Lavamiento. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. Evitar pipetas con piezas de metal para dispensar la Solución cromógena y la Solución de Parada. El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Con el fin de evitar anomalias, el tiempo de espera entre la dispensación del primero calibrador y de la última muestra debe ser limitado al tiempo mencionado a la sección XIII párrafo E (Tiempo de espera). Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo. Dispensar la Solución cromógena en menos de 15 minutos después del lavamiento de la placa de microvaloración. Durante la incubación con la Solución cromógena, evitar la luz solar directa sobre la placa de microvaloración.

B. Protocolo

1. Seleccionar el nombre requerido de tiras para el ensayo. Las tiras sin usar tienen que ser selladas en el saco con un desicante y guardadas a 2-8°C.
2. Fijar las tiras en el soporte.
3. Pipetar 50 µl del Tampón de Incubación en cada pocillo.
4. Pipetar 200 µl de cada Calibrador, Control y Muestra en los pocillos apropiados.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirar el líquido de cada pocillo.
7. Lavar la placa 4 veces:
 - Dispensar 0.4 ml de la Solución de Lavado en cada pocillo
 - Aspirar el contenido de cada pocillo
8. Pipetar 100 µl del conjugado anti-PTH-HRP en cada pocillo.
9. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirar el líquido de cada pocillo.
11. Lavar la placa 4 veces:
 - Dispensar 0.4 ml de la Solución de Lavado en cada pocillo
 - Aspirar el contenido de cada pocillo
12. Pipetar 100 µl de la solución cromógena en menos de 15 minutos después de la fase de lavamiento.
13. Incubar la placa de microvaloración durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 700 rpm ± 100 rpm, evitar la luz solar directa.
14. Pipetar 200 µl de la Solución de Parada en cada pocillo.
15. Leer las absorbancias a 450 nm y 490 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en menos de 1 hora y calcular los resultados como descrito en la sección XI.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

Lectura policromática:

1. En este caso, el software ELISA-AID™ hace el procesamiento de los datos.
2. Primero, la placa se lee a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
3. Una segunda lectura es efectuada a 490 nm contra el mismo filtro de referencia.
4. El software ELISA-AID™ activa automaticamente el lector y integra los dos lecturas en un modelo policromático. Esta técnica puede generar OD hasta 10.
5. El principio del procesamiento de datos policromático consiste en:
 - $X_i = OD$ a 450 nm
 - $Y_i = OD$ a 490 nm
 - Los parámetros A & B son calculados utilizando una regresión linear no pesada estándar: $Y = A \cdot X - B$
 - Si $X_i < 3$ unidades OD, X calculado = X_i
 - Si $X_i > 3$ unidades OD, X calculado = $(Y_i - B) / A$
 - Se utiliza una elaboración de curva logística “4 parámetros” para hacer la curva de calibración.
 - La concentración de la PTH en las muestras es determinada por interpolación de la curva de calibración.

B. Lectura bicromática

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular el promedio de las determinaciones dobles.
3. Poner sobre un papel semi-logaritmico o linear los valores OD (ordenada) para cada calibrador contra la concentración de PTH correspondiente (abscisa) y construir la curva de calibración por la conexión de los puntos de calibración con líneas rectas.
4. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación de la curva de calibración.
5. La reducción de datos asistido por ordenador puede facilitar estos cálculos. Si se utiliza el procesamiento de resultados automático, recomendamos la función logística de 4 parámetros.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

hPTH-ELISA		unidades OD modelo policromático
Calibrador	0 pg/ml	0,050
	22 pg/ml	0,149
	70 pg/ml	0,344
	224 pg/ml	0,999
	666 pg/ml	2,721
	1400 pg/ml	4,483

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.
El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 2 ng/ml.

B. Especificidad

Hormonas o fragmentos que podrían presentar una reacción cruzada fueron añadidos al calibrador cero, a un calibrador con un valor elevado (900 pg/ml) y a un calibrador con un valor bajo (100 pg/ml). La respuesta PTH aparente fue medida.

Substancia	No interferencia importante hasta
Fragmento sintético PTH 1-34, humano	1000 pg/ml
Fragmento sintético PTH 44-68, humano	20000 pg/ml
Fragmento sintético PTH 53-84, humano	20000 pg/ml
Fragmento sintético PTH 73-84, humano	100000 pg/ml
Proteína emparentada al fragmento sintético PTH 1-34, humana	100000 pg/ml

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	41,0 ± 0,5	1,1	A	20	45,7 ± 3,3	7,1
B	10	594 ± 12	2,0	B	20	381 ± 11,1	2,9

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
suero	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN			
Muestra	PTH añadido (pg/ml)	PTH Recuperado (pg/ml)	Recuperado (%)
Suero	371	333	90
Plasma heparina	371	347	93
Plasma EDTA	371	350	94

- E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra
- Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 60 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los pocillos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA					
	T0	15 min	30 min	45 min	60 min
S1	158	146	166	144	137
S2	77	72	70	67	72
S3	328	320	323	342	357
S4	260	250	250	258	251

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas. Controles que contienen azida interfieren con la reacción enzimática y no pueden ser utilizados.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.
- Recomendamos que los controles sean probados como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo tiene que ser controlado con cartas de control de calidad de los controles.
- Recomendamos un control visual de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

	N	Mediana (pg/ml)	Alcance (pg/ml)
Pacientes normales	156	29	16 - 46
Hiperparatiroidismo	64	291	106 - > 1000
Hipoparatiroidismo	11	0	0 – 6,4

El alcance es basado en percentilos de 5% a 95%

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar contacto de la piel con los reactivos, la Solución de Parada contiene HCl, el Solución cromógena contiene TMB. En caso de contacto lavar con abundante agua.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. HABENER J.F., and POTTE J.T., Jr. (1978)
"Biosynthesis of parathyroid hormone".
New Engl. J. Med., 299, 11:580 and 299, 12:635.
2. MARTIN K.J., HRUSKA K.A., FREITAG J.J., KLAH S. and SLOPOLSKY E. (1979)
"The peripheral metabolism of parathyroid hormone".
New Engl. J. Med., 301, 20:1092.

3. GOLTZMAN D., HENDERSON B. and LOVERIDGE N. "Cytochemical bioassay of PTH. (1980)
"Characteristics of the assay and analysis of circulating hormone forms".
J. Clin. Invest., 65:1309.
4. POTTS J.T. Jr., KRONENBERG H.M., ROSENBLATT M. (1982)
"Parathyroid hormone : Chemistry, biosynthesis and mode of action".
Adv. Protein Chem., 323.
5. HACKENG W.H.L., LIPS P., NETELENBOS J.C. and LIPS C.J.M. (1986)
"Clinical implication of estimation of intact parathyroid hormone (PTH) versus total immunoreactive PTH in normal subjects and hyperparathyroid patients".
J. Clin. Endocrinol. Metab., 63:447.
6. BOUILLON R., COOPMANS W., DE GROOTE D.E.H., RADOUX D., ELIARD P.H. (1990)
"Immunoradiometric assay of Parathyrin with polyclonal and monoclonal region specific antibodies".
Clin. Chem., 36/2:271-276.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(ES) (µl)
Tampón de incubación Calibradores (0 al 5) Muestras, controles	50 200 -	50 - 200
Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación continua a 700 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 4 veces con 400 µl de la Solución de Lavamiento y aspirar.		
Anti-PTH-HRP	100	100
Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua a 700 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 4 veces con 400 µl de la Solución de Lavamiento y aspirar.		
Solución cromógena	100	100
Incubar durante 30 min a temperatura ambiente con agitación continua a 700 rpm.		
Solución de Parada	200	200
Leer con un lector de placas de microvaloración y notar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (versus 630 o 650 nm) y 490 nm (versus 630 o 650 nm)		

DIAsource Catalogo Nr: KAP1481	P.I. Numero: 1700499/es	Revisión nr: 161123/1
-----------------------------------	----------------------------	--------------------------

Fecha de la revisión: 2016-11-23