

Instructions for Use

PTH IRMA

IVD

CE

REF RIA-3649

Σ 96



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



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

Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.

Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.

Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.

Por favor, se usa solo la versión válida de la metodico técnico incluido aquí en el kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE	3
2	CLINICAL BACKGROUND	3
3	PRINCIPLES OF THE METHOD.....	3
4	REAGENTS PROVIDED.....	4
5	SUPPLIES NOT PROVIDED	4
6	REAGENT PREPARATION	4
7	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS	5
8	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
9	PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS	6
11	TYPICAL DATA.....	6
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS.....	6
13	LIMITATIONS.....	8
14	INTERNAL QUALITY CONTROL	8
15	REFERENCE INTERVALS	8
16	PRECAUTIONS AND WARNINGS.....	8
17	SUMMARY OF THE PROTOCOL	9

1	VERWENDUNGSZWECK	10
2	KLINISCHER HINTERGRUND	10
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	10
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN	11
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL.....	11
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	12
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	12
8	PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG	12
9	DURCHFÜHRUNG	12
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	13
11	TYPISCHE WERTE	14
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	14
13	ANWENDUNGSGRENZEN	15
14	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	16
15	REFERENZ INTERVALLE	16
16	VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN.....	16
17	ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS	17

1	USO DEL KIT	18
2	INFORMAZIONI CLINICHE	18
3	PRINCIPIO DEL METODO	18
4	REATTIVI FORNITI.....	19
5	REATTIVI NON FORNITI.....	19
6	PREPARAZIONE DEI REATTIVI.....	20
7	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI.....	20
8	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	20
9	METODO DEL DOSAGGIO	20
10	CALCOLO DEI RISULTAT.....	21
11	CARATTERISTICHE TIPICHE	22
12	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO	22
13	LIMITAZIONI	24
14	CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO.....	24
15	INTERVALLI DI RIFERIMENTO	24
16	PRECAUZIONI PER L'USO.....	24
17	SCHEMA DEL DOSAGGIO	26
18	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	27
	SYMBOLS USED.....	28

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 Biological Activity

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 1 α -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.

2.2 Clinical Application

The measurement of intact hPTH by the present IRMA assay kit 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 Vitamin 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.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The PTH IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated-tube separation. It allows the determination of intact human PTH (hPTH) in serum and plasma. Goat antibodies specific to the 1-34 hPTH fragment (N-terminal fragment) are attached to the lower and inner surface of the plastic tubes. Calibrators or samples are added to the tubes. After 1 hour incubation, washing removes the occasional excess of antigen, mid-regional and C-terminal fragments.

¹²⁵I labelled monoclonal antibodies specific to the 44-68 hPTH fragment are added. After 1 hour incubation and washing the remaining radioactivity bound to the tube reflects the intact h-PTH concentration. This two-step IRMA is highly specific of the intact h-PTH and does not cross react with active and inactive fragments even at high concentrations as suggested by HACKENG and al.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	Quantity 96 tests	Reconstitution
	Tubes coated with anti PTH (goat antibodies)	2 x 48	Ready for use
Ab ¹²⁵I	Anti-PTH- ¹²⁵ I (monoclonal antibodies) in Borate Buffer with bovine casein, EDTA, sodium azide (<0.1 %)	1 vial 10.5 mL 680 kBq	Ready for use
CAL 0	Zero Calibrator in human plasma with thymol and benzamidin	1 vial lyophil.	Add 3 mL reconstitution solution
CAL N	Calibrators 1-6 in human plasma with thymol and benzamidin (see exact values on vial labels)	6 vials lyophil.	Add 2 mL reconstitution solution
REC SOLN	Reconstitution solution with EDTA and sodium azide (< 0.1%)	1 vial 26 mL	Ready for use
INC BUF	Incubation Buffer: Borate Buffer with sheep serum, EDTA and azide (< 0.1%)	1 vial 10.5 mL	Ready for use
WASH SOLN CONC	Wash solution (Tween 20-NaCl)	1 vial 50 mL	Dilute 28x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Controls 1 and 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	Add 2 mL reconstitution solution

Note:

1. Use the zero calibrator for sera dilutions.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 pg of NIBSC 95/646

5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 100 µL, 300 µL, 1 mL, 2 mL and 3 mL. (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker (700 rpm)
6. 5 mL automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional).
8. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

6 REAGENT PREPARATION**A. Calibrators:**

Reconstitute the zero calibrator with 3 mL reconstitution solution and the other calibrators with 2 mL reconstitution solution.

B. Controls:

Reconstitute the controls with 2 mL reconstitution solution.

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.

7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 °C - 8 °C.
- **The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20 °C for maximally 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.**
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 °C - 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma must be kept at 2 °C - 8 °C.

If the test is not run within 8 hours, storage at -20°C is recommended.

Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

Plasma (heparin and EDTA) provides higher results than serum.

$$Y(\text{serum}) = 1.01 \times (\text{EDTA plasma}) - 21.54 \quad r = 0.91 \quad n = 6$$

$$Y(\text{serum}) = 0.99 \times (\text{heparin plasma}) - 6.14 \quad r = 0.94 \quad n = 10$$

9 PROCEDURE

9.1 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 (18 °C - 25 °C) prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

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

9.2 Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 300 µL of each into the respective tubes.
3. Dispense 100 µL Incubation Buffer in each tube except those for total counts.
4. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. **Incubate for 1 hour at room temperature (18 °C - 25 °C) on a tube shaker (700 rpm).**
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash the tubes with 2 mL Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
9. Wash again the tubes with 2 mL Wash Solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Dispense 100 µL of anti-PTH-¹²⁵I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
12. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
13. **Incubate for 1 hour at room temperature (18 °C - 25 °C) on a tube shaker (700 rpm).**
14. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated-tube in order to remove all the liquid.
15. Wash the tubes with 2 mL Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
16. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
17. Wash again the tubes with 2 mL Wash Solution (except total counts) and aspirate (or decant).
18. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
19. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

10 CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi-logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of PTH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

11 TYPICAL DATA

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

PTH IRMA	cpm	B/T (%)
Total count	237132	100
Calibrator		
0 pg/mL	365	0.12
13.3 pg/mL	1402	0.46
35.8 pg/mL	4314	1.42
126.0 pg/mL	13688	4.50
447.0 pg/mL	37113	12.21
1007.0 pg/mL	71156	23.42
1562.0 pg/mL	95464	31.41

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 Limits of Detection

The limit of Blank (LoB) and Limit of Detection (LoD), were determined in accordance with the CLSI guideline EP17-A.

The LoB was calculated by measuring the blank several times and calculating the 95th percentile of the distribution of the tests values. The LoB was calculated to be 1.7 pg/mL.

The LoD was calculated as described in the guideline.

The LoD was calculated to be 3.8 pg/mL.

12.2 Specificity

Possible interfering peptides were added to a low and to a high PTH level serum. The apparent PTH response was measured.

Added analyte to a low PTH level serum	Observed PTH level (pg/mL)	Added analyte to a high PTH level serum	Observed PTH level (pg/mL)
Nothing	43	Nothing	444
hPTH 1-34 fragment	2000 pg/mL	hPTH 1-34 fragment	2000 pg/mL
hPTH 44-68 fragment	100000 pg/mL	hPTH 44-68 fragment	443
hPTH 73-84 fragment	100000 pg/mL	hPTH 73-84 fragment	448
hPTH-related protein 1-34 fragment	100000 pg/mL	hPTH-related protein 1-34 fragment	453
Nothing	11	Nothing	880
hPTH 53-84 fragment	100000 pg/mL	hPTH 53-84 fragment	841

This demonstrates that the PTH IRMA does not cross react with hPTH fragments and hPTH-related protein.

The assay performance is not affected by hemolysis (2.5 and 5 g/L haemoglobin tested) and by bilirubinemia (0.5 and 1g/L bilirubin tested). Bilirubin conjugate (0.5 g/L) and triglycerides (0.5, 1.0 and 2.5 g/L) don't interfere with this assay.

12.3 Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm S.D. (pg/mL)}$	CV (%)	Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm S.D. (pg/mL)}$	CV (%)
A	10	50.7 ± 2.1	4.2	C	20	95.9 ± 6.3	6.6
B	10	233.4 ± 6.6	2.8	D	20	342.1 ± 10.9	3.2

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added PTH (pg/mL)	Measured PTH concentrations		Recovery (%)
		Total (pg/mL)	Theoretical (pg/mL)	
1	0	17.9	-	-
	31	47.3	48.9	97%
	100	110.5	117.9	94%
	200	212.0	217.9	97%
2	0	146.6	-	-
	31	162.8	177.6	92%
	100	227.9	246.6	92%
	200	317.8	346.6	92%

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Conc. (pg/mL)	Measured Conc. (pg/mL)	Recovery (%)
1	1/1	-	711.9	-
	1/2	356.0	363.5	102%
	1/4	178.0	185.0	104%
	1/8	89.0	86.7	97%
	1/16	44.5	39.9	90%
	1/32	22.2	20.2	91%
	1/64	11.1	9.8	88%
2	1/1	-	532.7	-
	1/2	266.4	270.9	90%
	1/4	133.2	137.4	103%
	1/8	66.6	72.6	109%
	1/16	33.3	32.6	98%
	1/32	16.6	18.4	111%
	1/64	8.3	9.4	113%

Samples were diluted with zero calibrator.

12.5 Time Delay

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105.5	109	95.5	109.5	108.4
C2	264.7	266.6	273.2	257.9	258.7

12.6 Hook Effect

No high dose Hook effect was observed with hPTH concentration up to 10 000 pg/mL. A sample spiked with hPTH up to 10 000 pg/mL gives higher cpm's than the last calibrator point.

13 LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays.
Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.
If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

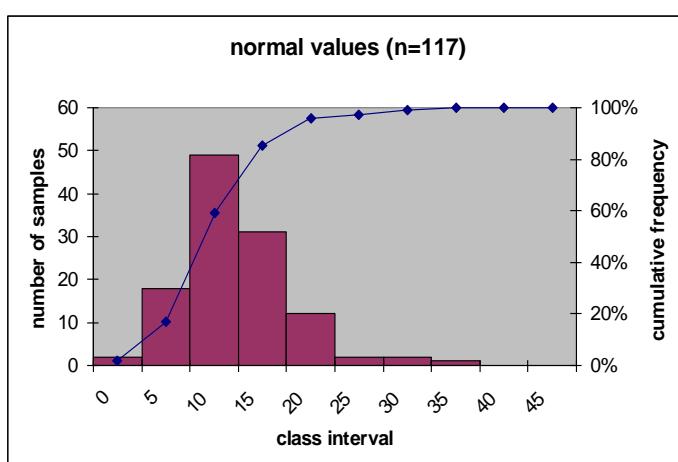
14 INTERNAL QUALITY CONTROL

- 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.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

15 REFERENCE INTERVALS

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

The range of PTH levels in 117 normal patients (serum), expressed as 2.5% to 97.5% percentiles, was 6.2 to 29 pg/mL.



16 PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

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 reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

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

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS mL	CALIBRATORS mL	SAMPLE(S) CONTROLS mL
Calibrators (0-6)	-	0.3	-
Samples, controls		-	0.3
Incubation Buffer	-	0.1	0.1
Incubation	1 hour at room temperature (18 °C - 25 °C) with shaking at 700 rpm		
Separation	-	aspirate (or decant)	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Tracer	0.1	0.1	0.1
Incubation	1 hour at room temperature (18 °C - 25 °C) with shaking at 700 rpm		
Separation	-	aspirate (or decant)	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DRG confirms that the kit is valid for use on the platform Stratec Riamat 300.

If you need any additional information, please contact drg@drg-diagnostics.de.

1 VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Parathormon (PTH) in Serum und Plasma.

2 KLINISCHER HINTERGRUND

2.1 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 tubulären 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 aminotermrale Fragmente und biologisch inaktive carboxyl-terminalen Fragmente entstehen. Die carboxyl-terminalen Fragmente werden nur durch Glomerulusfiltration geklärt, während das bioaktive intakte PTH und aminotermrale 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.

2.2 Klinische Anwendung

Die Messung von intaktem hPTH durch den vorliegenden IRMA-Kit 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 tumor-induzierter Hypercalcämie.

3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der PTH IRMA ist ein Zwei-Schritt immunradiometrischer Assay in beschichteten Röhrchen. Er ermöglicht die Bestimmung von intaktem humanem PTH (hPTH) in Serum und Plasma. Ziegen-Antikörper, die für das 1-34 hPTH Fragment (N-terminales Fragment) spezifisch sind, werden unten und innen an den Kunststoffröhren angebracht. Kalibratoren oder Proben werden in die Röhrchen zupipettiert. Nach einer Inkubation von 1 Stunde werden eventuelle Überschüsse von Antigen, mittelregionalen und C-terminalen Fragmenten abgewaschen.

^{125}I -markierte monoklonale Antikörper, die für das 44-68 hPTH Fragment spezifisch sind, werden zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 Stunde und Abwaschen reflektiert die verbleibende Radioaktivität, die an die Röhrchen gebunden ist, die Konzentration an intaktem hPTH. Dieser Zwei-Schritt-IRMA ist hochspezifisch für das intakte hPTH und weist keine Kreuzreaktion mit aktiven und inaktiven Fragmenten auf, auch nicht bei hohen Konzentrationen, wie sie durch HACKENG et al. angeführt werden.

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
	Mit anti PTH-beschichtete Röhrchen (Ziegen-Antikörper)	2 x 48	gebrauchsfertig
Ab ¹²⁵I	¹²⁵ Iodmarkierter Anti-PTH (monoklonale Antikörper) in Boratpuffer mit bovinem Kasein, EDTA, Azid (<0,1%)	1 Gefäß 10,5 mL 680 kBq	gebrauchsfertig
CAL 0	Null Kalibrator in humanem Plasma, Thymol und Benzamidin	1 Gefäß lyophil.	3 mL Rekonstitutionslösung zugeben
CAL N	Kalibrator - N = 1 to 6, In humanem Plasma, thymol und benzamidin (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)	6 Gefäße lyophil.	2 mL Rekonstitutionslösung zugeben
REC SOLN	Rekonstitutionslösung mit EDTA und Azid (< 0,1%)	1 Gefäß 26 mL	gebrauchsfertig
INC BUF	Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Schafserum, EDTA und Azide (< 0.1%)	1 Gefäß 10,5 mL	gebrauchsfertig
WASH SOLN CONC	Waschlösung (Tween 20-NaCl), Konzentrat	1 Gefäß 50 mL	28 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N	Kontrollen - N = 1 oder 2, Humanes Plasma und Thymol	2 Gefäße lyophil.	2 mL Rekonstitutionslösung zugeben

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
 2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 1 pg NIBSC 95/646.

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 100 µL, 300 µL, 1 mL, 2 mL und 3 mL (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 mL automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
4. Absaugsystem (optional)
5. Röhrchenschüttler (700 rpm)
6. Vortex Mixer
7. Magnetrührer
8. Jegl. Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

A. Kalibratoren:

Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 3 mL Rekonstitutionslösung, die anderen Kalibratoren mit 2 mL Rekonstitutionslösung.

B. Kontrollen:

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 mL Rekonstitutionslösung.

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.

7 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 - 8 °C stabil.
- **Die Kalibratoren und Kontrollen sind sehr instabil, sie sind sofort nach Rekonstitution zu verwenden, sofort in Aliquots einzufrieren und bei -20 °C höchstens 3 Monate zu lagern. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.**
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2 °C - 8 °C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

8 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Serum- und Plasmaproben müssen bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden.

Falls der Test nicht innerhalb von 8 Stunden durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20 °C erforderlich.

Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA und Heparin) liefern ähnliche Ergebnisse.

$$Y(\text{Serum}) = 1,01 \times (\text{EDTA Plasma}) - 21,54 \quad r = 0,91 \quad n = 6$$

$$Y(\text{Serum}) = 0,99 \times (\text{Heparin Plasma}) - 6,14 \quad r = 0,94 \quad n = 10$$

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 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 (18 °C - 25 °C).

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

9.2 Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie jeweils 300 µL in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 100 µL des Inkubationspuffers in jedes Röhrchen (außer Gesamtaktivität).
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. **Inkubieren Sie 1 Stunden bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) auf einem Röhrchenschüttler (700 rpm).**
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 mL Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 mL Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11. Geben Sie 100 µL des Tracers anti-PTH-¹²⁵I in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
12. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
13. **Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) auf einem Röhrchenschüttler (700 rpm).**
14. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
15. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 mL Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
16. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
17. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 mL Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
18. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
19. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration PTH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
4. 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.

11 TYPISCHE WERTE

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

PTH IRMA	cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität	237132	100
Kalibrator		
0 pg/mL	365	0,12
13,3 pg/mL	1402	0,46
35,8 pg/mL	4314	1,42
126,0 pg/mL	13688	4,50
447,0 pg/mL	37113	12,21
1007,0 pg/mL	71156	23,42
1562,0 pg/mL	95464	31,41

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

12.1 Nachweisgrenze

Die Leerwertgrenze (LoB) und die Nachweisgrenze (LoD) wurden in Übereinstimmung mit der CLSI-Richtlinie EP17-A bestimmt.

Die LoB wurde durch mehrfache Messung des Leerwertes und durch Kalkulation von 95 Prozent der Verteilung der Testwerte ermittelt. Die LoB wurde mit 1,7 pg/mL bestimmt.

Die LoD wurde, wie in der Richtlinie beschrieben kalkuliert.

Die LoD wurde mit 3,8 pg/mL bestimmt.

12.2 Spezifität

Möglicherweise interferierende Peptide wurden einem Serum mit niedrigem und hohem PTH-Wert zugesetzt. Das scheinbare PTH Ergebnis wurde gemessen.

Analytzugabe zu Serum mit niedrigem PTH-Wert	Beobachteter PTH-Wert (pg/mL)	Analytzugabe zu Serum mit hohem PTH-Wert	Beobachteter PTH-Wert (pg/mL)
Nichts	43	Nichts	444
hPTH 1-34 Fragment 2000 pg/mL	42	hPTH 1-34 Fragment 2000 pg/mL	443
hPTH 44-68 Fragment 100000 pg/mL	44	hPTH 44-68 Fragment 100000 pg/mL	448
hPTH 73-84 Fragment 100000 pg/mL	45	hPTH 73-84 Fragment 100000 pg/mL	453
hPTH-bezogenes Protein 1-34 Fragment 100000 pg/mL	42	hPTH-bezogenes Protein 1-34 Fragment 100000 pg/mL	436
Nichts	11	Nichts	880
hPTH 53-84 Fragment 100000 pg/mL	18,4	hPTH 53-84 Fragment 100000 pg/mL	841

Das beweist, dass der PTH IRMA keine Kreuzreaktion mit hPTH Fragmenten und hPTH-bezogenem Protein aufweist.

Die Assayleistung wird nicht durch Hämolyse beeinträchtigt (2,5 und 5 g/L Hämoglobin-getestet) und durch Bilirubinämie (0,5 und 1g/L Bilirubin-getestet). Bilirubinkonjugat (0,5 g/L) und Triglyceride (0,5; 1,0 und 2,5 g/L) interferieren nicht mit diesem Assay.

12.3 Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$\text{} \pm \text{S.D.}$ (pg/mL)	CV (%)	Serum	N	$\text{} \pm \text{S.D.}$ (pg/mL)	CV (%)
A	10	$50,7 \pm 2,1$	4,2	C	20	$95,9 \pm 6,3$	6,6
B	10	$233,4 \pm 6,6$	2,8	D	20	$342,1 \pm 10,9$	3,2

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

12.4 Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Hinzugefügt PTH (pg/mL)	Gemessene PTH Konzentration		Wiederfindung (%)
		Total (pg/mL)	Theoretisch (pg/mL)	
1	0	17,9	-	-
	31	47,3	48,9	97%
	100	110,5	117,9	94%
	200	212,0	217,9	97%
2	0	146,6	-	-
	31	162,8	177,6	92%
	100	227,9	246,6	92%
	200	317,8	346,6	92%

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (pg/mL)	Gemess. Konzent. (pg/mL)	Wiederfindung (%)
1	1/1	-	711,9	-
	1/2	356,0	363,5	102%
	1/4	178,0	185,0	104%
	1/8	89,0	86,7	97%
	1/16	44,5	39,9	90%
	1/32	22,2	20,2	91%
	1/64	11,1	9,8	88%
2	1/1	-	532,7	-
	1/2	266,4	270,9	90%
	1/4	133,2	137,4	103%
	1/8	66,6	72,6	109%
	1/16	33,3	32,6	98%
	1/32	16,6	18,4	111%
	1/64	8,3	9,4	113%

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND

	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

12.6 Hook-Effekt

Bei einer hPTH-Konzentration von bis zu 10 000 pg/mL wurde kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet. Eine mit bis zu 10 000 pg/mL hPTH angereicherte Probe führt zu höheren cpm-Werten als der letzte Kalibrierpunkt.

13 ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren.

Patienten, die routinemäßig Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden.

Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

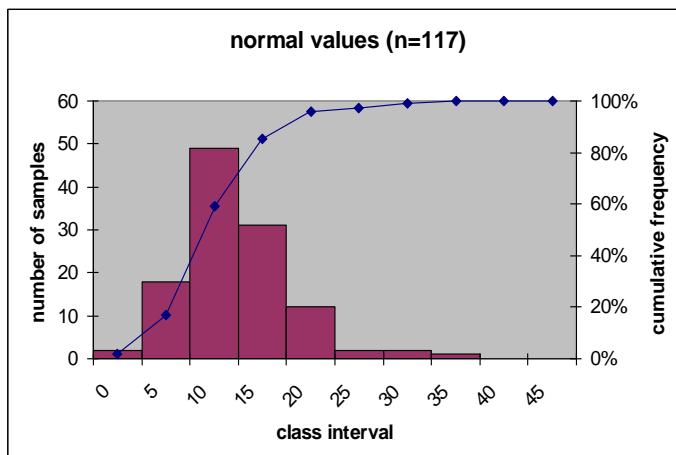
14 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

15 REFERENZ INTERVALLE

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

Der Bereich der PTH-Werte bei 117 gesunden Patienten (Serum), ausgedrückt als 2,5% bis 97,5% Perzentilen, betrug 6,2 bis 29 pg/mL.



16 VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

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 den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriften den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

17 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (mL)	KALIBRATOREN (mL)	PROBE(N) KONTROLLEN (mL)
Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	- - -	0,3 - 0,1	- 0,3 0,1
Inkubation	1 Std. bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) durch Schütteln bei 700 rpm		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekantieren) 2,0 absaugen (oder dekantieren) 2,0 absaugen (oder dekantieren)	
Tracer	0,1	0,1	0,1
Inkubation	1 Std. bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) durch Schütteln bei 700 rpm		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekantieren) 2,0 absaugen (oder dekantieren) 2,0 absaugen (oder dekantieren)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DRG bestätigt, dass dieser Test auf der Plattform Stratec Riamat 300 abgearbeitet werden kann.
 Wenn Sie zusätzliche Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an drg@drg-diagnostics.de.

1 USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'ormone paratiroideo (PTH) umana in siero o plasma.

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 Attività biologiche

L'ormone paratiroideo umano (hPTH) è uno dei principali regolatori fisiologici del metabolismo del calcio e del fosforo. L'hPTH fa aumentare le concentrazioni di calcio nel siero agendo sui reni (aumentando il riassorbimento tubolare del Ca⁺⁺ e l'escrezione dei fosfati) e sulle ossa (stimolando l'attività osteoclastica e il riassorbimento osseo). Questo ormone influenza in maniera indiretta sull'assorbimento intestinale del Ca⁺⁺ stimolando la 1α-idrossilazione renale della 25-idrossivitamina D. Il rilascio del PTH è controllato da un meccanismo di feedback negativo sulla base della concentrazione di Ca⁺⁺ nel siero.

Il PTH viene sintetizzato nelle cellule principali delle ghiandole paratiroidee e viene secreto in forma di molecola di 84 aminoacidi detta "PTH intatto", che rappresenta il principale prodotto bioattivo. Questa molecola viene degradata dal taglio proteolitico tra gli aminoacidi 33-37 nei punti periferici per formare frammenti aminoterminali biologicamente attivi e frammenti carbossil-terminali biologicamente inattivi. I frammenti carbossil-terminali sono eliminati esclusivamente per filtrazione glomerulare, mentre il PTH bioattivo intatto e i frammenti aminoterminali vengono degradati metabolicamente nel fegato e in altri tessuti. L'emivita dei frammenti carbossil-terminali aumenta sensibilmente nei pazienti affetti da insufficienza renale. Pertanto, la misurazione del PTH intatto si correla meglio con la produzione ormonale e l'attività biologica.

2.2 Applicazione clinica

La misurazione del hPTH intatto mediante questo kit di misurazione serve a diagnosticare eventuali condizioni di iperparatiroidismo primario in base ai livelli di PTH bioattivo nel siero. Essa consente inoltre di documentare la presenza di iperparatiroidismo secondario nei pazienti interessati da carenza di vitamina D, problemi di malassorbimento intestinale oppure insufficienza renale. Nell'ultimo caso, è particolarmente indicativa l'assenza di interferenza con i frammenti carbossil-terminali inattivi. Data la specificità e l'elevata sensibilità di questa verifica, è possibile anche differenziare chiaramente i livelli bassi di PTH nel siero nei casi di ipoparatiroidismo o nell'ipercalcemia indotta da tumore.

3 PRINCIPIO DEL METODO

PTH IRMA è una verifica immunoradiometrica in due fasi basata sul principio di separazione in provetta rivestita. Essa consente di determinare la presenza di PTH umano intatto (hPTH) nel siero o plasma. Gli anticorpi di capra specifici per il frammento hPTH 1-34 (frammento N-terminale) vengono fissati sulla superficie inferiore e interna delle provette in plastica. Alle provette vengono aggiunti calibratori o campioni. Dopo 1 ora di incubazione, con il lavaggio vengono eliminati eventuali eccessi di antigene e i frammenti centro-regionali e C-terminali.

Al frammento specifico 44-68 hPTH vengono aggiunti gli anticorpi monoclonali ¹²⁵I-marcati. Dopo 1 ora di incubazione e dopo aver lavato la radioattività residua legata al tubo è possibile rilevare la concentrazione di h-PTH intatto. Questa procedura IRMA in due fasi è altamente specifica per il h-PTH intatto e non cross-reagisce con i frammenti attivi e inattivi neanche ad alte concentrazioni come suggerito da HACKENG et al.

4 REATTIVI FORNITI

	Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
	Provette sensibilizzate con anticorpo anti PTH (anticorpi di capra)	2 x 48	Pronte per l'uso
Ab ¹²⁵I	Marcato, anti-PTH (Anticorpi monoclonali) marcati con ¹²⁵ I in tampone borato con BSA, sodio azide (<0,1%), EDTA	1 flacone 10,5 mL 680 kBq	Pronto per l'uso
CAL 0	Calibratore zero in plasma umano contenente benzamidina e timolo	1 vial liofiliz.	Aggiungere 3 mL di soluzione di ricostituzione
CAL N	Calibratore 1-6 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano contenente benzamidina e timolo	6 flaconi liofiliz.	Aggiungere 2 mL di soluzione di ricostituzione
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione con EDTA e sodio azide (< 0,1%)	1 vial 26 mL	Pronto per l'uso
INC BUF	Tampone di incubazione: Tampone borato con siero di pecora, EDTA e azide (< 0.1%)	1 vial 10,5 mL	Pronto per l'uso
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio (Tween 20-NaCl)	1 flacone 50 mL	Diluire 28 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N	Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano contenente timolo	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 2 mL di acqua distillata

Note:

1. Usare Calibratore zero per diluire i campioni.
2. 1 pg di preparato di taratura corrisponde a 1 pg NIBSC 95/646.

5 REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 100 µL, 300 µL, 1 mL, 2 mL e 3 mL (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore per provette (700 g/m)
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 mL per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

A. Calibratore:

Ricostituire lo calibratore zero con 3,0 mL di soluzione di ricostituzione e gli altri calibratori con 2,0 mL di soluzione di ricostituzione.

B. Controlli:

Ricostituire i controlli con 2,0 mL di soluzione di ricostituzione.

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 (28 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- **Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono molto instabili, quindi utilizzarli immediatamente dopo la ricostituzione. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20 °C per un periodo non superiore a 3 mesi. Evitare cicli consecutivi di congelamento-scongelamento**
- 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 marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2 °C - 8 °C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Conservare il siero e il plasma a 2 °C - 8 °C.

Se la prova non viene eseguita entro 8 ore, si consiglia di conservare a -20 °C.

Evitare cicli consecutivi di congelamento-scongelamento.

Il plasma (eparina e EDTA) produce risultati più elevati rispetto al siero.

$$Y(\text{siero}) = 1,01 \times (\text{plasma EDTA}) - 21,54 \quad r = 0,91 \quad n = 6$$

$$Y(\text{siero}) = 0,99 \times (\text{plasma eparina}) - 6,14 \quad r = 0,94 \quad n = 10$$

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 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 (18 °C a 25 °C).

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

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.

9.2 Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 300 µL di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 100 µL di tampone di incubazione in ogni provetta, ad eccezione di quelle per l'attività totale.
4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 1 ora a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) in un agitatore per provette (700 g/m).
6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
9. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
10. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Dispensare 100 µL di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
12. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
13. Incubare 1 ora a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) in un agitatore per provette (700 g/m).
14. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
15. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
16. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
17. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
18. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
19. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplice.
2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di PTH. Scartare i risultati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

11 CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di PTH in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

PTH IRMA	cpm	B/T (%)
Attività totale	237132	100
Calibratore 0 pg/mL	365	0,12
13,3 pg/mL	1402	0,46
35,8 pg/mL	4314	1,42
126,0 pg/mL	13688	4,50
447,0 pg/mL	37113	12,21
1007,0 pg/mL	71156	23,42
1562,0 pg/mL	95464	31,41

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 Limiti di rilevazione

Il limite del bianco (LoB) e il limite di rilevazione (LoD) sono stati stabiliti secondo le linee guida CLSI EP17-A.

Il LoB è stato calcolato misurando più volte il bianco e calcolando il 95° percentile della distribuzione dei valori dei test. Il LoB è risultato essere pari a 1,7 pg/mL.

Il LoD è stato calcolato come descritto nelle linee guida.

Il LoD è risultato essere pari a 3,8 pg/mL.

12.2 Specificità

Eventuali peptidi interferenti sono stati aggiunti a un siero con un livello basso e alto di PTH. Si è misurata la reazione apparente del PTH.

Analita aggiunto a un siero a bassa concentrazione di PTH		Livello di PTH osservato (pg/mL)	Analita aggiunto a un siero a alta concentrazione di PTH		Livello di PTH osservato (pg/mL)
Nulla		43	Nulla		444
frammento 1-34 hPTH	2000 pg/mL	42	frammento 1-34 hPTH	2000 pg/mL	443
frammento 44-68 hPTH	100000 pg/mL	44	frammento 44-68 hPTH	100000 pg/mL	448
frammento 73-84 hPTH	100000 pg/mL	45	frammento 73-84 hPTH	100000 pg/mL	453
proteina legata al hPTH			proteina legata al hPTH		
frammento 1-34	100000 pg/mL	42	frammento 1-34	100000 pg/mL	436
Nulla		11	Nulla		880
frammento 53-84 hPTH	100000 pg/mL	18,4	frammento 53-84 hPTH	100000 pg/mL	841

Questo dimostra che il PTH IRMA non cross-reagisce con i frammenti di hPTH e la proteina legata al hPTH.

Le prestazioni del saggio non sono influenzate dall'emolisi (valutazione eseguita con 2,5 e 5 g/L di emoglobina) e dalla bilirubinemia (valutazione eseguita con 0,5 e 1 g/L di bilirubina). La bilirubina coniugata (0,5 g/L) e i trigliceridi (0,5; 1,0 e 2,5 g/L) non interferiscono con questo saggio.

12.3 Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	$\text{} \pm \text{S.D.}$ (pg/mL)	CV (%)	Siero	N	$\text{} \pm \text{S.D.}$ (pg/mL)	CV (%)
A	10	$50,7 \pm 2,1$	4,2	C	20	$95,9 \pm 6,3$	6,6
B	10	$233,4 \pm 6,6$	2,8	D	20	$342,1 \pm 10,9$	3,2

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

12.4 Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	PTH aggiunto (pg/mL)	Concentrazione di PTH misurato		Recupero (%)
		Totale (pg/mL)	Teorica (pg/mL)	
1	0	17,9	-	-
	31	47,3	48,9	97%
	100	110,5	117,9	94%
	200	212,0	217,9	97%
2	0	146,6	-	-
	31	162,8	177,6	92%
	100	227,9	246,6	92%
	200	317,8	346,6	92%

TEST DI DILUZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/mL)	Concentrazione misurata (pg/mL)	Recupero (%)
1	1/1	-	711,9	-
	1/2	356,0	363,5	102%
	1/4	178,0	185,0	104%
	1/8	89,0	86,7	97%
	1/16	44,5	39,9	90%
	1/32	22,2	20,2	91%
	1/64	11,1	9,8	88%
2	1/1	-	532,7	-
	1/2	266,4	270,9	90%
	1/4	133,2	137,4	103%
	1/8	66,6	72,6	109%
	1/16	33,3	32,6	98%
	1/32	16,6	18,4	111%
	1/64	8,3	9,4	113%

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

12.5 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 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

12.6 Hook Effetto

Non è stato osservato un effetto Hook con concentrazione di hPTH fino a 10 000 pg/mL. Un campione arricchito con hPTH fino a 10 000 pg/mL fornisce cpm più elevati rispetto all'ultimo punto del calibratore.

13 LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

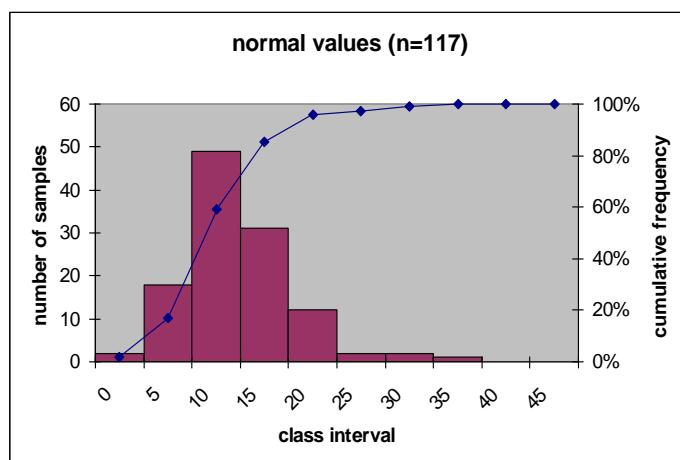
14 CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- 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.
- I criteri di accettazione per la differenza tra i risultati doppi dei campioni devono riflettere la Buona prassi di laboratorio

15 INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Il range dei livelli di PTH in 117 pazienti normali (siero), espresso in percentili da 2,5% a 97,5% era compreso tra 6,2 e 29 pg/mL.



16 PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

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 ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

17 SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale µL	Calibratore µL	Campioni Controlli µL
Calibratore (0-6)	-	300	-
Campioni, controlli	-	-	300
Tampone di incubazione	-	100	100
Incubazione	1 ora a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) agitando a 700 g/m		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio	Aspirare 2 mL		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio	Aspirare 2 mL		
Separazione	Aspirare		
Marcato	100	100	100
Incubazione	1 ora a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) agitando a 700 g/m		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio	Aspirare 2 mL		
Separazione Soluzione di lavoro tampone di lavaggio	Aspirare 2 mL		
Separazione	Aspirare		
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

DRG conferma che il test è valido per l'uso sulla piattaforma Stratec Riamat 300

Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta drg@drg-diagnostics.de.

18 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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. BOUILLOU 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.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnistica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade