



hPTH-120 min-IRMA

KIP1491

Version : 231214

Date of issue : 14/12/2023

Revision date: 14/12/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123	New Version: 231214
	Correction of a TYPO in the French, German, Spanish and Greek versions: Chapter <i>XIII. Performance and Limitations</i> <i>A. Limits of Detection</i> Correction of the units from ng/ml into pg/ml for the LOB and LOD

Read entire protocol before use.

hPTH-120 min-IRMA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Catalog number :** KIP1491: 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 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 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 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 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 DIASource hPTH-120 min-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.

V. REAGENTS PROVIDED

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

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

VI. 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%).

VII. 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.

VIII. 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 to 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 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and plasma must be kept at 2 – 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.

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

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

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 (18-25°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.

B. 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 (18-25°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 (18-25°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.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. 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.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. 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-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		303886	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

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Limits of Detection

The limit of Blank (LoB) and the 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.

B. 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	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-related protein 1-34 fragment 100000 pg/ml	42	hPTH-related protein 1-34 fragment 100000 pg/ml	436
Nothing	11	Nothing	880
hPTH 53-84 fragment 100000 pg/ml	18.4	hPTH 53-84 fragment 100000 pg/ml	841

This demonstrates that the hPTH-120 min-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.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± 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

D. 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 Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (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.

E. 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

F. Hook Effect

No high dose Hook effect was observed with hPTH concentration up to 10000 pg/ml. A sample spiked with hPTH up to 10000 pg/ml gives higher cpm's than the last calibrator point.

XIV. 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.

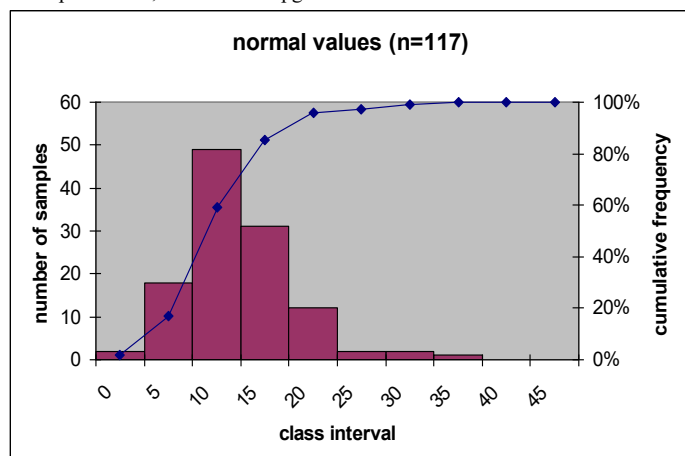
XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- 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

XVI. 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.



XVII. 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.

XVIII. 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.

XIX. 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 (18-25°C) (18-25°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 (18-25°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		

Diasource's Instrumentation Service confirms that the kit is valid for use on the platform Stratec Riamat 300. If you need any additional information, please contact IVDInstrumentation@diasource.be

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hPTH-120 min-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique 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-120 min-IRMA Kit
- B. Numéro de catalogue :** KIP1491 : 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 par cette trousse IRMA est utilisée pour faire le diagnostic de l'hyperparathyroïdisme primaire en démontrant des taux en PTH bioactifs élevés dans le sérum. Elle permet de documenter l'occurrence de l'hyperparathyroïdisme secondaire chez 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 trousse DIAsource hPTH-120 min-IRMA est une trousse immunoradiométrique à deux phases basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Elle rend possible la détermination de la PTH humaine intacte (hPTH) dans le sérum et le plasma. Des anticorps de chèvre, spécifiques pour le fragment 1-34 hPTH (fragment N-terminal) sont attachés à la surface basse et interne des tubes en plastique. Les calibrateurs ou les échantillons sont ajoutés aux tubes. Après une heure d'incubation, un lavage enlève les éventuels fragments d'antigène, mi-régionaux et C-terminaux superflus. Des anticorps monoclonaux marqués avec du ¹²⁵I, spécifiques pour le fragment 44-68 hPTH, sont ajoutés. Après une heure d'incubation et un lavage, la radioactivité restante liée à la tube indique la concentration en h-PTH intacte. Cette trousse IRMA à deux phases est très spécifique pour la h-PTH intacte et ne présente pas de réaction croisée avec des fragments actifs et inactifs, même à des concentrations élevées comme indiqué par HACKENG et al.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti PTH (anticorps de chèvre)	2 x 48	Blanc	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: anti-PTH marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux)) dans un tampon borate avec de la caséine bovine, EDTA, de l'azide de sodium (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 10,5 ml 680 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du plasma humain et du thymol et de la benzamidine	CAL	0	1 flacon lyophil.	Jaune	Ajouter 3 ml solution de reconstitution	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 6 dans du plasma humain avec du thymol et de la benzamidine (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon)	CAL	N	6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml solution de reconstitution	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Solution de reconstitution avec EDTA et de l'azide de sodium (< 0,1%)	REC	SOLN	1 flacon 26 ml	Blue	Prêt à l'emploi	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon d'Incubation: Tampon Borate avec du sérum de brebis, EDTA et de l'azide (<0,1%)	INC	BUF	1 flacon 10,5 ml	Vert	Prêt à l'emploi	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 50 ml	Brun	Diluer 28 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml solution de reconstitution	
CONTROL	N					

Note: 1. Utiliser le Calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 pg du NIBSC 95/646.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 100 µl, 300 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 tubes (700 rpm)
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 3 ml de solution de reconstitution et les autres calibrateurs avec 2 ml de solution de reconstitution.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 2 ml de solution de reconstitution.
- 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.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables et doivent être utilisés immédiatement après la reconstitution, congelés immédiatement dans des aliquots et gardés à -20°C pendant 3 mois au maximum. 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 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.
 - Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
 - Le plasma(Héparine et EDTA) donne des résultats plus élevés que le sérum.
- Y(sérum) = 1,01 x (plasma EDTA) – 21,54

r=0,91

n=6

Y(sérum) = 0,99 x (plasma héparine) – 6,14

r=0,94

n=10

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 trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 300 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Distribuer 100 µl de Tampon d'Incubation dans chaque tube, à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue (700 rpm).
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la

- pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d’eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale). Eviter la formation de mousse pendant l’addition de la Solution de Lavage.
 - Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale).
 - Laver les tubes encore avec 2 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer (ou décantier).
 - Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décantier) le reste de liquide.
 - Distribuer 100 µl de anti-PTH-¹²⁵I traceur dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l’activité totale.
 - Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d’air emprisonnée.
 - Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue (700 rpm).
 - Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d’eux pour éliminer toute trace de liquide.
 - Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale). Eviter la formation de mousse pendant l’addition de la Solution de Lavage.
 - Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale)
 - Laver les tubes encore avec 2 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer (ou décantier).
 - Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décantier) le reste de liquide.
 - Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en PTH (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l’aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
- Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- 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-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		303886	100
Calibrateur	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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limites de détection

La limite du blanc (LoB) et la limite de détection ont été déterminées en suivant la directive CLSI EP17-A.

La LoB a été calculée en mesurant le blanc plusieurs fois et en calculant le percentile 95 de la distribution des valeurs d'analyse. La LoB calculée est de 1,7 pg/mL.

La LoD a été calculée comme décrit dans la directive. La LoD calculée est de 3,8 pg/mL.

B. Spécificité

Des peptides qui pourraient interférer ont été ajoutés à un sérum avec un taux en PTH bas et à un sérum avec un taux en PTH élevé. La réponse PTH apparente a été mesurée.

Réactif ajouté à un sérum avec un taux en PTH bas	Taux en PTH observé (pg/ml)	Réactif ajouté à un sérum avec un taux en PTH élevé	Taux en PTH observé (pg/ml)
Rien	43	Rien	444
Fragment hPTH 1-34 2000 pg/ml	42	Fragment hPTH 1-34 2000 pg/ml	443
Fragment hPTH 44-68 100000 pg/ml	44	Fragment hPTH 44-68 100000 pg/ml	448
Fragment hPTH 73-84 100000 pg/ml	45	Fragment hPTH 73-84 100000 pg/ml	453
Protéine apparentée à la hPTH		Protéine apparentée à la hPTH	
Fragment 1-34 100000 pg/ml	42	Fragment 1-34 100000 pg/ml	436
Rien	11	Rien	880
Fragment hPTH 53-84 100000 pg/ml	18,4	Fragment hPTH 53-84 100000 pg/ml	841

Ceci démontre que la hPTH-120 min-IRMA ne présente pas de réaction croisée avec des fragments hPTH et la protéine apparentée à la hPTH.

Les performances du test n’est pas affecté par l’hémolyse (testé avec 2,5 et 5 g/L) et par la Bilirubinémie (testé avec 0,5 et 1 g/L). La Bilirubine conjuguée (0,5 g/L) et les triglycérides (0,5; 1,0 et 2,5 g/L) n’interfère pas avec les tests.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± 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 : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION				
Echantillon	PTH ajoutée (pg/ml)	Concentrations mesurée de PTH		Récupération (%)
		Total (pg/ml)	Théorique (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 DE DILUTION				
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)	Récupération (%)
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%

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 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l’anticorps.

F. Effet Hook

Aucun effet de Hook n'a été observé avec des concentrations de hPTH allant jusqu'à 10000 pg/ml. Un échantillon dopé avec 10000 pg/ml donne des cpm plus élevé que le dernier point du calibrateur.

DELAI					
	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

XIV. LIMITATIONS

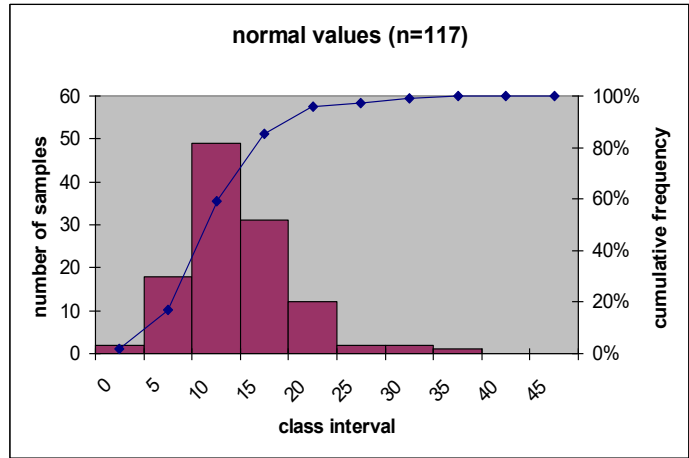
- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousses d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro.
- Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
- Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTROLE 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 critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d' information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.
La portée des taux en PTH chez 117 patients normaux (sérum), exprimée comme 2,5% à 97,5% percentiles, était 6,2 à 29 pg/ml.



XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de I¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits

radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.
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.
L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- 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 SLOPOLSKY 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.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRA- TEURS (ml)	ECHANTIL- LON(S) CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-6)	-	0,3	-
Echantillons,	-	-	0,3
Contrôles	-	0,1	0,1
Tampon			
d'Incubation			
Incubation	1 heures à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue (700 rpm)		
Séparation	-	Aspiration (ou décarter)	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	Aspiration (ou décarter)	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	Aspiration (ou décarter)	
Traceur	0,1	0,1	0,1
Incubation	1 heures à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue (700 rpm)		
Séparation	-	Aspiration (ou décarter)	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	Aspiration (ou décarter)	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	Aspiration (ou décarter)	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Le service d'instrumentation de Diasource confirme que le kit est valable pour une utilisation sur la plate-forme Stratec Riamat 300. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, veuillez contacter IVDInstrumentation@diasource.be

Lees het hele protocol vóór gebruik.

hPTH-120 min-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van Humaan Parathyroid Hormoon (PTH) in serum en plasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. Gedeponiseerd handelsmerk:** DIAsource hPTH-120 min-IRMA kit
- B. Catalogusnummer:** KIP1491: 96 testen
- C. Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:
Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische werkingsmechanismen

Humaan parathyroid hormoon (hPTH) is een belangrijke fysiologische regulator van het fosfo-calcium metabolisme. hPTH verhoogt de calciumconcentraties in serum door zijn werking op de nieren (verbetert de tubulaire Ca^{++} reabsorptie en de fosfaatexcretie) en in de beenderen (stimuleert de osteoclastische activiteit en de beenderresorptie). Het beïnvloedt onrechtstreeks de intestinale absorptie van Ca^{++} door het stimuleren van renale 1α -hydroxylatie van 25 hydroxyvitamine D. De vrijgave van PTH wordt gecontroleerd in een negatieve feedback door de concentratie van Ca^{++} in serum.

PTH wordt gesynthetiseerd in de hoofdcellen van de bijnierschlier en afgescheiden als een molecule met 84 aminozuren genoemd "intact PTH", die het voornaamste bioactieve product is. Deze molecule wordt gedegeerd door proteolytische splitising tussen aminozuren 33-37 op perifere sites om biologisch actieve amino-terminale fragmenten te vormen en biologisch inactieve carboxyl-terminale fragmenten. De carboxyl-terminale fragmenten worden enkel gezuiverd door glomerulaire filtratie, terwijl het bioactieve intact PTH en de amino-terminale fragmenten ook metabolisch gedegeerd worden in de lever en andere weefsels. Het halfleven van de carboxyl-terminale fragmenten verhoogt dramatisch in patiënten met nierfalen. Zo correleert de meting van intact PTH best met de hormoonproductie en de biologische activiteit.

B. Klinische toepassing

De meting van intact hPTH door deze IRMA testkit wordt gebuikt om de diagnose te stellen van primair hyperparathyroidisme door het aantonen van een verhoogd gehalte van bioactieve PTH in serum. Het laat toe de verschijning te documenteren van secundair hyperparathyroidisme bij patiënten met Vit.D deficiëntie, intestinale malabsorptie, of nierfalen. In deze laatste situatie is vooral de afwezigheid van interferentie met de inactieve carboxyl-terminale fragmenten waardevol. De specificiteit en de hoge gevoeligheid van de test laten ook een duidelijk onderscheid toe tussen een laag PTH-gehalte in serum bij hypoparathyroidisme of bij tumor-geïnduceerde hypercalciëmie.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

hPTH-120 min-IRMA van DIAsource is een twee-staps immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis . Het laat de determinatie toe van intact humaan PTH (hPTH) in serum en plasma. Geitantilichamen, specifiek voor het 1-34 hPTH fragment (N-terminaal fragment) worden bevestigd op de onder- en binnenkant van de plastic buisjes. Kalibrators of monsters worden aan de buisjes toegevoegd. Na 1 uur incubatie worden het eventuele overbodige antigenen en de mid-regionale en C-terminale fragmenten geweggewassen. Monoklonale antilichamen gelabelled met ¹²⁵I, specifiek voor het 44-68 hPTH fragment worden toegevoegd. Na 1 uur incubatie en wassen, geeft de overgebleven radioactiviteit gebonden aan het buisje de concentratie van intact h-PTH weer. Deze twee-staps IRMA is zeer specifiek voor intact h-PTH en kruisreageert niet met actieve en inactieve fragmenten, zelfs bij hoge concentraties zoals voorgesteld door HACKENG et al.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie
 buizen gecoate met anti-PTH (geit antilichamen)	2 x 48	wit	Klaar voor gebruik
Ab^{125I} TRACER: Anti-PTH (monoklonale antilichamen) in Boraat Buffer met bovien caseïne, EDTA, azide (< 0,1%)	1 flacon 10,5 ml 680 kBq	rood	Klaar voor gebruik
CAL0 Nulkalibrator in humaan plasma met thymol en benzamidine	1 flacon gevries-droogd	geel	3 ml reconstitutieoplossing toevoegen
CALN Kalibrator - N = 1 tot 6 in humaan plasma met thymol en benzamidine. (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden)	6 flacons, gevries-droogd	geel	2 ml reconstitutieoplossing toevoegen
REC SOLN Reconstitutieoplossing met EDTA en sodium azide (< 0,1%)	1 flacon 26 ml	blauw	Klaar voor gebruik
INC BUF Incubatiebuffer: Boraat Buffer met schapen serum, EDTA en azide (<0,1%)	1 flacon 10,5 ml	groen	Klaar voor gebruik
WASH SOLN CONC Wasoplossing (Tween 20-NaCl)	1 flacon 50 ml	bruin	28 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
CONTROL N Controles - N = 1 of 2 in humaan plasma en thymol	2 flacons, gevries-droogd	zilver	2 ml reconstitutieoplossing toevoegen

Opmerking: 1. Gebruik de Nulkalibrator voor monsterverdunningen.
2. 1 pg van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 pg NIBSC 95/646.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2 ml en 3 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Schudder voor de buisjes (700 rpm).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.

8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de nulkalibrator met 3 ml reconstitutieoplossing en de andere kalibrators met 2 ml reconstitutieoplossing.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 2 ml reconstitutieoplossing.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 27 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (28 x). Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- De klirators en de controles zijn heel onstabiel; gebruik ze onmiddellijk na de reconstitutie, vries ze onmiddellijk in aliquots in en bewaar ze bij -20°C gedurende maximum 3 maanden. Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasma moeten bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 8 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien
- Serum (heparine en EDTA) leveren hogere resultaten op dan serum.
 $Y(\text{serum}) = 1,01 \times (\text{EDTA plasma}) - 21,54$ $r=0,91$ $n=6$
 $Y(\text{serum}) = 0,99 \times (\text{heparine plasma}) - 6,14$ $r=0,94$ $n=10$

X. PROCEDURE

- A. **Opmerkingen bij de procedure**
Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur (18-25°C) (18-25°C) komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.
- B. **Procedure**
- Etiketeer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketeer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
 - Vortex de kalibrators, controles en monsters gedurende korte tijd en pipetteer 300 µl van elk in de desbetreffende buis.
 - Pipetteer 100 µl van de Incubatiebuffer in elke buis met uitzondering van de totaal tellingen.
 - Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtbelllen vrijkomen.
 - Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C) (18-25°C) terwijl er voortdurend mee geschud wordt (700 rpm).
 - Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
 - Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
 - Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).

9. Was de buizen opnieuw met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
10. Na de laatste wassing, laat de buizen gedurende twee minuten rechtop staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
11. Pipetteer 100 µl van anti-PTH-¹²⁵I van de tracer in elke buis, inclusief de niet gecoat buisjes voor de totaal tellingen.
12. Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
13. Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C) (18-25°C) terwijl er voortdurend mee geschud wordt (700 rpm).
14. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoat buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
15. Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
16. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
17. Was de buizen opnieuw met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
18. Na de laatste wassing, laat de buizen gedurende twee minuten rechtop staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
19. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige PTH -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
3. Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
4. Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
- Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		303886	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

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

- A. Detectielimieten
- De limiet van Blank (LoB), Detectielimiet (LoD) werden bepaald in overeenstemming met de CLSI-richtlijn EP17-A.
- De LoB werd berekend door de blanco verschillende keren te meten en het 95e percentiel van de verdeling van de testwaarden te berekenen. De LoB werd berekend als 1,7 pg / ml.
- De LoD werd berekend zoals beschreven in de richtlijn. De LoD werd berekend als 3,8 pg / ml.
- B. Specificiteit
- Mogelijk interfererende peptiden werden toegevoegd aan een serum met een laag en met een hoog PTH-gehalte. De bijhorende respons van PTH werd gemeten.

Toegevoegd reagens aan een serum met een laag PTH-gehalte	Vastgestel d PTH-gehalte (pg/ml)	Toegevoed reagens aan een serum met een hoog PTH-gehalte	Vastgestel d PTH-gehalte (pg/ml)
Niets	43	Niets	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-gerelateerd proteïne		hPTH-gerelateerd proteïne	
1-34 fragment 100000 pg/ml	42	1-34 fragment 100000 pg/ml	436
Niets	11	Niets	880
hPTH 53-84 fragment 100000 pg/ml	18.4	hPTH 53-84 fragment 100000 pg/ml	841

Dit toont aan dat de hPTH-120 min-IRMA niet kruisreageert met hPTH fragmenten en hPTH-gerelateerd proteïne.

Hemolyse (getest bij 2,5 en 5 g/l hemoglobine) en bilirubinemie (getest bij 0,5 en 1 g/l bilirubine) hebben geen invloed op de werking van de test. Geconjugeerde bilirubine (0,5 g/l) en triglyceriden (0,5; 1,0 en 2,5 g/l) verstoren deze test niet.

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± 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: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST				
Monster	Toegevoegd PTH (pg/ml)	Gemeten PTH-concentraties		Recovery (%)
		Totaal (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%

VERDUNNINGSTEST				
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (pg/ml)	Gemeten concentratie (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%

De monsters zijn verdund met de nulkalibrator.

- E. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster
- Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator over de gecoat buizen gedistribueerd wordt.

TIJDSPANNE

	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

F. Hook-effect

Er werd geen hoog dosis-Hook-effect waargenomen met een hPTH-concentratie tot 10000 pg / ml. Een monster met hPTH tot 10000 pg / ml geeft hogere cpm's dan het laatste kalibratorpunt.

XIV. BEPERKINGEN

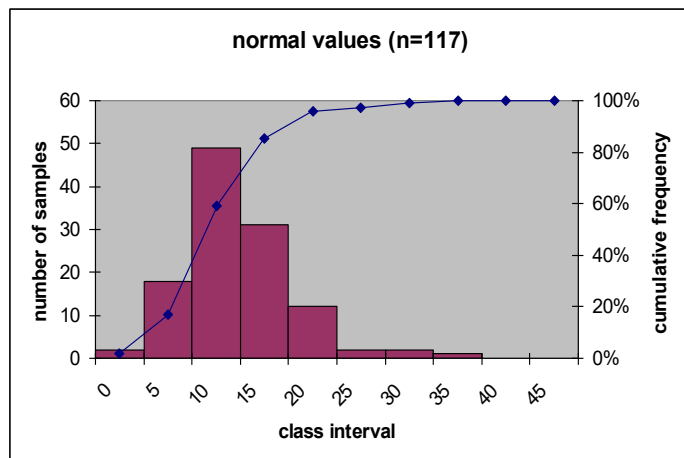
- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays. Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben. Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken. Het bereik van het PTH-gehalte bij 117 normale patiënten (serum), uitgedrukt als 2,5% tot 97,5% percentielen, was 6,2 tot 29 pg/ml.

**XVII. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN****Veiligheid**

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVIII. BIBLIOGRAFIE

- 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 SLOPOLSKY 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., NETELNBOS 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.

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (ml)	KALIBRA-TORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -6)	-	0,3	-
Monsters, Controles	-	-	0,3
Incubatiebuffer	-	0,1	0,1
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C) (18-25°C) met schudden aan 700 rpm		
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0	
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0	
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Tracer	0,1	0,1	0,1
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur (18-25°C) (18-25°C) met schudden aan 700 rpm		
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0	
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0	
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

De instrumentatiedienst van Diasource bevestigt dat de kit is geldig voor gebruik op het platform Stratec Riamat 300. Neem voor meer informatie contact op met IVDInstrumentation@diasource.be

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hPTH-120 min-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. Handelsbezeichnung :** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Katalognummer :** KIP1491 : 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 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.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hPTH-120 min-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 Kunststoffröhrchen 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. ¹²⁵I-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.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution			
 Mit anti PTH-beschichtete Röhrchen (Ziegen-Antikörper)	2 x 48	weiß	gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iodmarkierter Anti-PTH (monoklonale Antikörper) in Boratpuffer mit bovinem Kasein, EDTA, Azid (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 Gefäß 10,5 ml 680 kBq	rot	gebrauchsfertig	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null Kalibrator in humanem Plasma, Thymol und benzamidin	CAL	0	1 Gefäß lyophil.	gelb	3 ml Rekonstitutionslösung zugeben	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 to 6 In humanem Plasma, thymol und benzamidin (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)	CAL	N	6 Gefässe lyophil.	gelb	2 ml Rekonstitutionslösung zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Rekonstitutionslösung mit EDTA und Azid (< 0,1%)	REC	SOLN	1 Gefäß 26 ml	blau	gebrauchsfertig	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Schafserum, EDTA und Azide (<0,1%)	INC	BUF	1 Gefäß 10,5 ml	grün	gebrauchsfertig	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 50 ml	braun	28 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 or 2 Humanem Plasma und Thymol	CONTROL	N	2 Gefässe lyophil.	silber	2 ml Rekonstitutionslösung zugeben	
CONTROL	N					

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:
- Dest. Wasser
 - Pipetten: 100 µl, 300µl, 1 ml, 2 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
 - 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
 - Absaugsystem (optional)
 - Röhrchenschüttler (700 rpm)
 - Vortex Mixer
 - Magnetrührer
 - Jegl. Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. 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.

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.
- Die Kalibratoren und Kontrollen sind sehr instabil, sie sind sofort nach Rekonstitution zu verwenden, sofort aliquot 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° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- und 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.
- Vermeiten Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Serum- oder Plasmaproben (EDTA und heparinisiertes) liefern ähnliche Ergebnisse.
 $Y(\text{Serum}) = 1,01 \times (\text{EDTA Plasma}) - 21,54 \quad r=0,91 \quad n=6$
 $Y(\text{Serum}) = 0,99 \times (\text{heparinisiertes Plasma}) - 6,14 \quad r=0,94 \quad n=10$

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 (18-25°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.
- B. **Durchführung**
- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
 - Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie jeweils 300 µl in ihre Röhrchen.
 - Geben Sie 100 µl des Inkubationspuffer in jedes Röhrchen (außer Gesamtaktivität).
 - Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
 - Inkubieren Sie 1 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrchenschüttler (700 rpm).
 - 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.
 - Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
 - Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
 - Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
 - Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
 - Geben Sie 100 µl des Tracers anti-PTH-¹²⁵I in jedes Röhrchen, einschließlch der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
 - Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
 - Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°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.

XI. 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.

XII. TYPISCHE WERTE

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		303886	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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Die Grenzen von Leerwert (LoB), von Nachweis (LoD) wurden in Übereinstimmung mit der CLSI Richtlinie EP17-A bestimmt. LoB wurde durch mehrfache Messung des Leerwertes und durch Kalkulation von 95 Prozent der Verteilung der Testwerte ermittelt. Der Leerwert 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.

B. Spezifität

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

Analyt zu einem Serum mit niedrigem PTH-Wert		Beobachteter PTH Wert (pg/ml)	Analyt zu einem 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 hPTH-120 min-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 Triglyzeride (0,5; 1,0 und 2,5 g/l) interferieren nicht mit diesem Assay.

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± 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 : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST				
Probe	Hinzugef. PTH (pg/ml)	Gemessene PTH Konzentration		WIEDERFINDUNG (%)
		Insgesamt (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. Konz. (pg/ml)	Gemess. Konz. (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.

E. 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

F. Hook-Effekt

Bei einer hPTH-Konzentration von bis zu 10000 pg / ml wurde kein Hook-Effekt mit hoher Dosis beobachtet. Eine mit hPTH bis zu 10000 pg / ml dotierte Probe führt zu höheren cpm-Werten als der letzte Kalibrierpunkt.

XIV. 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 routinemäßigen 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.

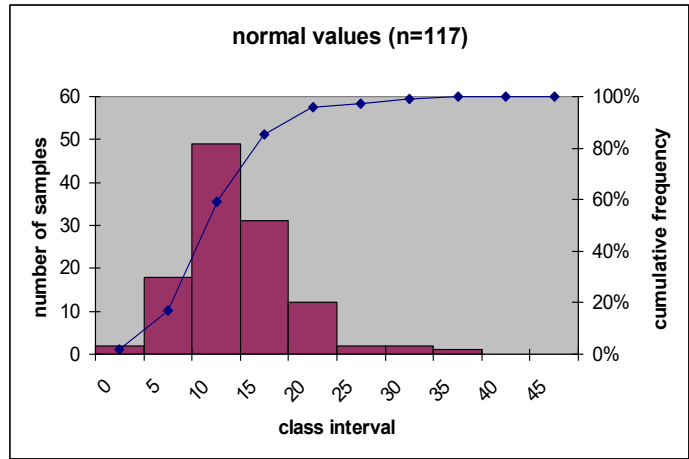
XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- 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.

XVI. REFERENZINTERVALLE

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.



XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 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 Waschschrte 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.

XVIII.LITERATUR

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.

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA-TOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-6)	-	0,3	-
Proben, Kontrollen	-	-	0,3
Inkubationspuffer	-	0,1	0,1
Inkubation	1 Std. bei Raumtemperatur (18-25°C) durch Schütteln bei 700 rpm		
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2,0	
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2,0	
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Tracer	0,1	0,1	0,1
Inkubation	1 Std. bei Raumtemperatur (18-25°C) durch Schütteln bei 700 rpm		
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2,0	
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	
Waschlösung	-	2,0	
Trennung	-	absaugen (oder dekant.)	

Gamma Counter	60 Sekunden messen
---------------	--------------------

Der Instrumentation Service von Diasource bestätigt dies Das Kit ist gültig für den Einsatz auf der Plattform Stratec Riamat 300. Wenn Sie zusätzliche Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an IVDInstrumentation@diasource.be



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

hPTH-120 min-IRMA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A, Nome commerciale:** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B, Numero di catalogo:** KIP1491: 96 tests
- C, Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S,A,
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio,

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 (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 influisce 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 paratiroidi 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.

B, 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.

IV, PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource hPTH-120 min-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,

V, REATTIVI FORNITI

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

Note:

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

VI, REATTIVI NON FORNITI

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

- Acqua distillata,
- 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),
- Agitatore tipo vortex,
- Agitatore magnetico,
- Agitatore per provette (700 g/m)

- Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi,
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo),
- Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII, PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 3,0 ml di soluzione di ricostituzione e gli altri calibratori con 2,0 ml di soluzione di ricostituzione,
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 2,0 ml di soluzione di ricostituzione,
- 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,

VIII, CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°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-scongelo
- 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 2-8°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

- Conservare il siero e il plasma a 2 – 8°C,
- Se la prova non viene eseguita entro 8 ore, si consiglia di conservare a – 20°C,
- Evitare cicli consecutivi di congelamento-scongelo, Il plasma (eparina e EDTA) produce risultati più elevati rispetto al siero, Y(siero) = 1,01 x (plasma EDTA) – 21,54 r=0,91 n=6 Y(siero) = 0,99 x (plasma eparina) – 6,14 r=0,94 n=10

X, METODO DEL DOSAGGIO

- 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 (18-25°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,
- Metodo del dosaggio**
 - Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo, Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale,
 - Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli, Dispensare 300 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette,
 - Dispensare 100 µl di tampone di incubazione in ogni provetta, ad eccezione di quelle per l'attività totale,
 - Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette,
 - Incubare 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) ,in un agitatore per provette (700 g/m),
 - 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 (18-25°C) ,in un agitatore per provette (700g/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,

XI, CALCOLO DEI RISULTAT

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato,
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,

XII, 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,

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		303886	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

XIII, CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Limiti di rilevazione

Il limite del bianco (LoB), 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 line guida. Il LoD è risultato essere pari a 3,8 pg/ml.

B, 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 hPTH100000 pg/ml	44	frammento 44-68 hPTH100000 pg/ml	448
frammento 73-84 hPTH100000 pg/ml	45	frammento 73-84 hPTH100000 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

Questo dimostra che il hPTH-120 min-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,

C, Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (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 : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D, 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				
Campion e	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,

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 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

F. Hook Effetto

Nessuna dose elevata È stato osservato un effetto Hook con concentrazione di hPTH fino a 10000 pg / ml. Un campione arricchito con hPTH fino a 10000 pg / ml fornisce cpm più elevati rispetto all'ultimo punto del calibratore.

XIV, LIMITAZIONI

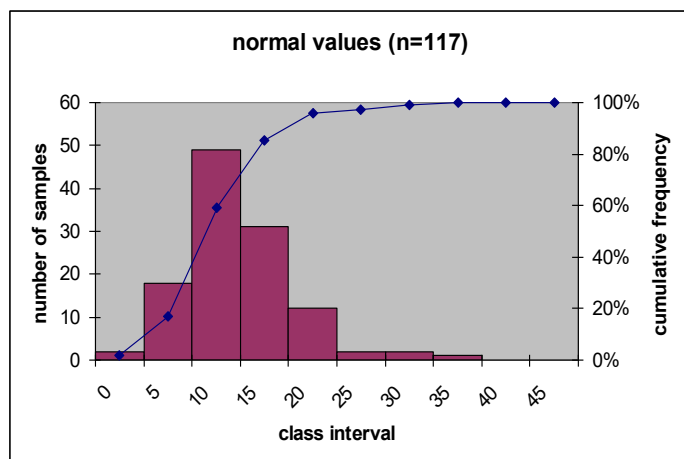
- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre 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,

XV, 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

XVI, 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,



XVII, PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro, Il kit contiene ¹²⁵I (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,

XVIII, 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 SLOPOLSKY E, (1979) "**The peripheral metabolism of parathyroid hormone**", New Engl, J, Med., 301, 20:1092, J, Clin, Invest., 65:1309,
3. GOLTZMAN D., HENDERSON B, and LOVERIDGE N, "Cytochemical bioassay of PTH, (1980) **Characteristics of the assay and analysis of circulating hormone forms**",
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,

XIX, 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 (18-25°C) agitando a 700 g/m		
Separazione		Aspirare 2 ml	
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			
Separazione		Aspirare 2 ml	
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			
Separazione		Aspirare	
Marcato	100	100	100
Incubazione	1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) agitando a 700 g/m		
Separazione		Aspirare 2 ml	
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			
Separazione		Aspirare 2 ml	
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			
Separazione		Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Il servizio di strumentazione di Diasource lo conferma il kit è valido per l'uso sulla piattaforma Stratec Riamat 300. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta IVDInstrumentation@diasource.be

Leer el protocolo completo antes de usar.

hPTH-120 min-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP1491 : 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 mejor con la producción hormonal y la actividad biológica.

B. Aplicación clínica

La medición de la hPTH intacta por este ensayo IRMA 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

hPTH-120 min-IRMA de DIAsource es un radioinmunoensayo con dos fases basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Permite la determinación de la PTH intacta humana (hPTH) en suero y plasma. Anticuerpos de cabra específicos para el fragmento 1-34 hPTH (fragmento N-terminal) son inmovilizados en las paredes interiores y inferiores de tubos de plástico. Los calibradores o las muestras son añadidos a los tubos. Después de 1 hora de incubación, un lavamiento quita el exceso ocasional de antígeno, fragmentos medio regionales y C-terminales. Anticuerpos monoclonales marcados con ¹²⁵I específicos para el fragmento hPTH 44-68 son añadidos. Después de una incubación de 1 hora y un lavamiento, la radiactividad ligada al tubo indica la concentración de h-PTH intacta. Este IRMA con dos fases es muy específico para la h-PTH intacta y presenta ninguna reacción cruzada con fragmentos activos y inactivos, incluso con concentraciones elevados como mencionan HACKENG et al.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti PTH (anticuerpos de cabra)	2 x 48	Blanco	Listo para uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRAZADOR: anti-PTH (anticuerpos monoclonales) en Tampón Borato con caseína bovina, EDTA, azida (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 vial 10,5 ml 680 kBq	rojo	Listo para uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador cero en plasma humana y thymol y benzamidina	CAL	0	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 3 ml de solución de reconstitución	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores N = 1 a 6 en plasma humana y thymol y benzamidina (mirar los valores exactos en las etiquetas)	CAL	N	6 viales líoofilizados	amarillo	Añadir 2 ml de solución de reconstitución	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de Reconstitución con EDTA y azida (< 0,1%)	REC	SOLN	1 viales 26 ml	azul	Listo para uso	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de Incubación: Tampón Borato con suero de oveja, EDTA y azida (<0,1%)	INC	BUF	1 viales 10,5 ml	verde	Listo para uso	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 50 ml	marrón	Diluir 28 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 En plasma humano y thymol.	CONTROL	N	2 viales líoofilizados	plateado	Añadir 2 ml de solución de reconstitución	
CONTROL	N					

- Nota:**
- Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
 - 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 1 pg NIBSC 95/646.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit
- Agua destilada
 - Pipetas de 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
 - Vortex

- Agitador magnético
- Agitador de tubos
- Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3 ml de solución de reconstitución y otros calibradores con 2 ml de solución de reconstitución.
- Controles:** Reconstituir los controles con 2 ml de solución de reconstitución.
- 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.
- Los calibradores y los controles son muy inestables, utilizar inmediatamente después de la reconstitución, congelar inmediatamente en alícuotas y guardar a -20°C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador 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 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.
- Plasma (heparina y EDTA) proporciona resultados más elevados que el Suero.
Y(suero) = 1,01 x (plasma EDTA) – 21,54 r=0,91 n=6
Y(suero) = 0,99 x (plasma heparina) – 6,14 r=0,94 n=10

X. PROTOCOLO

- 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 (18-25°C) antes de su uso.
Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.
- Protocolo**
 - Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 - Agitar brevemente los calibradores, controles y muestras y dispensar 300 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispensar 100 µL del Tampón de Incubación en cada tubo, excepto los de Cuentas Totales.
 - Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
 - Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en agitación constante (700 rpm).
 - Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 - Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.

8.

Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
9.

Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). .
10.

Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
11.

Dispensar 100 µL del anti-PTH-¹²⁵I trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
12.

Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
13.

Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en agitación constante (700 rpm).
14.

Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
15.

Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
16.

Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
17.

Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). .
18.

Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
19.

Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1.

Calcular la media de los duplicados.
2.

Representar en un gráfico semilogarítmico o lineal el c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de PTH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3.

Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4.

Métodos computarizados de proceso de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		303886	100
Calibrador	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

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límites de la detección

El Límite del Blanco (LoB), el Límite de Detección (LoD) se determinaron según la directriz EP17-A del CLSI.

El LoB se calculó midiendo el blanco varias veces y calculando el percentil 95 de la distribución de los valores de la prueba. El cálculo determino que el LoB fue 1,7 pg/ml.

El LoD se calculó como se describe en la directriz. El cálculo determinó que el LoD fue 3,8 pg/ml.

B. Especificidad

Péptidos que podrían interferir fueron añadidos a un suero con un nivel de PTH bajo y a un suero con un nivel de PTH elevado. La respuesta aparente fue medida.

Substancia añadida a un suero con un nivel de PTH bajo	Nivel de PTH observado (pg/ml)	Substancia añadida a un suero con un nivel de PTH elevado	Nivel de PTH observado (pg/ml)
Nada	43	Nada	444
Fragmento hPTH 1-34 2000 pg/ml	42	Fragmento hPTH 1-34 2000 pg/ml	443
Fragmento hPTH 44-68 100000 pg/ml	44	Fragmento hPTH 44-68 100000 pg/ml	448
Fragmento hPTH 73-84 100000 pg/ml	45	Fragmento hPTH 73-84 100000 pg/ml	453
Proteína emparentada a la hPTH	42	Proteína emparentada a la hPTH	436
Fragmento 1-34 100000 pg/ml		Fragmento 1-34 100000 pg/ml	
Nada	11	Nada	880
Fragmento hPTH 53-84 100000 pg/ml	18,4	Fragmento hPTH 53-84 100000 pg/ml	841

Esta tabla indica que el hPTH-120 min-IRMA presenta ninguna reacción cruzada con los fragmentos hPTH y la proteína emparentada a la PTH.

El rendimiento del ensayo no se ve afectado por la hemólisis (se probó con 2,5 y 5 g/l de hemoglobina) ni por la bilirrubinemia (se probó con 0,5 y 1 g/l). El conjugado de bilirrubina (0,5 g/l) y los triglicéridos (0,5; 1,0 y 2,5 g/l) no interfieren con este ensayo.

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	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 : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DE RECUPERACIÓN				
Muestra	PTH añadido (pg/ml)	Concentración de PTH medida		Recuperado (%)
		Total (pg/ml)	Teórica (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 DILUCIÓN				
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)	Recuperación %
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%

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

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 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

	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

F. Hook Efecto

No se observó una dosis alta de efecto Hook con una concentración de hPTH de hasta 10000 pg / ml. Una muestra enriquecida con hPTH de hasta 10000 pg / ml produce cpm más altos que el último punto de calibración

XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

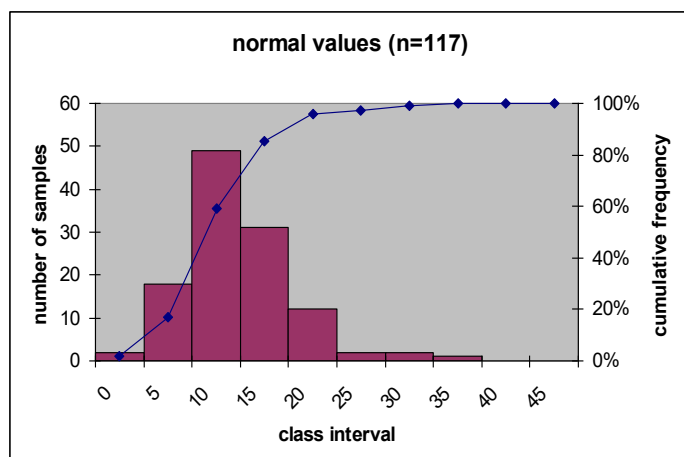
XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- 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.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

El alcance de los niveles de PTH levels en 117 pacientes normales (suero), expresado como percentilos de 2,5% a 97,5% fue 6,2 a 29 pg/ml.



XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

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 cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- 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 SLOPOLSKY 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.

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (ml)	CALIBRADORES (ml)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (ml)
Calibradores (0 al 6)	-	0,3	-
Muestras, controles	-	-	0,3
Tampón de Incubación	-	0,1	0,1
Incubación	1 hora a T.A. (18-25°C) en agitación constante en agitación constante (700 rpm).		
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado	-	2,0	
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado	-	2,0	
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Trazador	0,1	0,1	0,1
Incubación	1 hora a T.A. (18-25°C) en agitación constante en agitación constante (700 rpm).		
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado	-	2,0	
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado	-	2,0	
Separación	-	aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

El servicio de instrumentación de Diasource confirma que el kit es válido para usar en la plataforma Stratec Riamat 300. Si necesita información adicional, comuníquese con IVDInstrumentation@diasource.be

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

hPTH-120 min-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης παραθορμόνης (PTH) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ hPTH-120 min-IRMA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1491: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η ανθρώπινη παραθορμόνη (hPTH) είναι ένας σημαντικός φυσιολογικός ρυθμιστής του μεταβολισμού φωσφόρου-ασβεστίου. Η hPTH αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ασβεστίου στον ορό μέσω της δράσης της στους νεφρούς (ενίσχυση της επαναπορρόφησης του Ca^{++} από τα νεφρικά σωληνάκια και της έκκρισης φωσφόρου) και στα οστά (διέγερση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και της απορρόφησης των οστών). Επηρεάζει έμμεσα την εντερική απορρόφηση του Ca^{++} διεγείροντας τη νεφρική 1α-υδροξυλίωση της 25 υδροξυβιταμίνης D. Η απελευθέρωση της PTH ελέγχεται με ένα βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης από τη συγκέντρωση του Ca^{++} στον ορό.

Η PTH συντίθεται στα κύρια κύτταρα των παραθυρεοειδών αδένων και απεκκρίνεται ως μόριο 84 αμινοξέων το οποίο ονομάζεται "ακέραιη PTH" και είναι το κύριο βιοδραστικό προϊόν. Το μόριο αυτό αποδομείται μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης μεταξύ των αμινοξέων 33-37 σε περιφερικές θέσεις προς σχηματισμό βιολογικά δραστικών αμινοτελικών κλασμάτων και βιολογικά αδρανών καρβοξυλιοτελικών κλασμάτων. Τα καρβοξυλιοτελικά κλάσματα καθαρίζονται μόνο με σπειραματική διήθηση, ενώ η βιοδραστική ακέραιη PTH και τα αμινοτελικά κλάσματα αποδομούνται επίσης μέσω μεταβολισμού από το ήπαρ και άλλους ιστούς. Η ημιζωή των καρβοξυλιοτελικών κλασμάτων αυξάνεται εξαιρετικά σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Έτσι, η μέτρηση της ακέραιης PTH συσχετίζεται καλύτερα με την παραγωγή και τη βιολογική δράση ορμονών.

B. Κλινική εφαρμογή

Η μέτρηση της ακέραιης hPTH με το παρόν κιτ προσδιορισμών IRMA χρησιμοποιείται για τη διάγνωση πρωτοπαθούς υπερθυρεοειδισμού μέσω του εντοπισμού αυξημένων επιπέδων βιοδραστικής PTH στον ορό. Επιτρέπει την τεκμηρίωση δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού σε ασθενείς με ανεπάρκεια βιταμίνης D, εντερική δυσασπορρόφηση ή νεφρική ανεπάρκεια. Στην τελευταία περίπτωση, είναι ιδιαίτερα πολύτιμη η απουσία επίδρασης από τα αδρανή καρβοξυλιοτελικά κλάσματα. Η ειδικότητα και η υψηλή ευαισθησία του προσδιορισμού επιτρέπει επίσης της διαφοροποίηση σαφώς χαμηλών επιπέδων της PTH στον ορό σε υποπαραθυρεοειδισμό ή σε υπερασβαστιαμία επαγόμενη από όγκους.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση hPTH-120 min-IRMA της DIAsource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός δύο βημάτων, που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Επιτρέπει τον προσδιορισμό της ακέραιης ανθρώπινης PTH (hPTH) στον ορό και το πλάσμα. Αντισώματα αίγας ειδικά για το κλάσμα h PTH 1-34 (κλάσμα άκρου N) προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια των πλαστικών σωληναρίων. Στα σωληνάρια προστίθενται βαθμονομητές ή δείγματα. Μετά από 1 ώρα επώασης, αφαιρείται με πλύση τυχόν περίσσεια αντιγόνου, κλάσματα της μέσης περιοχής και του άκρου C. Προστίθενται μονοκλωνικά αντισώματα σημιασμένα με ¹²⁵I ειδικά για το κλάσμα hPTH 44-68. Μετά από 1 ώρα επώασης και την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση της hPTH. Αυτός ο προσδιορισμός IRMA δύο βημάτων είναι εξαιρετικά ειδικός για την ακέραιη h-PTH και δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με δραστικά και αδρανή κλάσματα ακόμη και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, όπως αναφέρουν οι HACKENG and al.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα 96 προσδιορι- σμοί	Χρωματι- κός κωδικός	Ανασύσταση			
 Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-PTH (αντισώματα)	2 x 48	λευκό	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Αντι-PTH (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ¹²⁵ I σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικών με βόεια καζεΐνη, EDTA, αζίδιο του νατρίου (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 φιαλίδιο 10,5 ml 680 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη και βενζαμιδίνη	CAL	0	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 3 ml διαλύματος ανασύστασης	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Βαθμονομητές 1-6 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη και βενζαμιδίνη (δείτε ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	CAL	N	6 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml διαλύματος ανασύστασης	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Διάλυμα ανασύστασης με EDTA και αζίδιο του νατρίου (< 0,1%)	REC	SOLN	1 φιαλίδιο 26 ml	μπλε	Έτοιμο για χρήση	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: ρυθμιστικό διάλυμα βορικών με ορό προβάτου, EDTA και αζίδιο (<0,1%)	INC	BUF	1 φιαλίδιο 10,5 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Διάλυμα πλύσης (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 50 ml	καφέ	Αραιώστε 28x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Οροί ελέγχου 1 και 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλ.	ασημί	Προσθέστε 2 ml διαλύματος ανασύστασης	
CONTROL	N					

Σημείωση: 1.Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.
2. 1 pg του παρασκευάσματος βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 pg NIBSC 95/646

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:
1. Απεσταγμένο νερό
 2. Πιπέτες για διανομή: 100 μl, 300 μl, 1 ml, 2 ml και 3 ml. (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη).
 3. Αναμεικτής στροβιλισμού
 4. Μαγνητικός αναδευτήρας
 5. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (700 rpm)
 6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
 7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό).
 8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 3 ml διαλύματος ανασύστασης και τους άλλους βαθμονομητές με 2 ml διαλύματος ανασύστασης.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml διαλύματος ανασύστασης.
- Γ. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 27 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (28x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιείτε τα αμέσως μετά την ανασύσταση, καταψύχετε αμέσως σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και διατηρείτε τα στους -20° C επί 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός και το πλάσμα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 8 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Δείγματα πλάσματος (σε ηπαρίνη και EDTA) εμφανίζουν υψηλότερες τιμές συγκρινόμενα με δείγματα ορού.

$$Y(\text{ορός}) = 1.01 \times (\text{EDTA πλάσμα}) - 21.54 \quad r=0.91 \quad n=6$$
$$Y(\text{ορός}) = 0.99 \times (\text{πλάσμα παρουσία ηπαρίνης}) - 6.14 \quad r=0.94 \quad n=10$$

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- B. **Διαδικασία**
1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
 2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 300 μl από έκαστο στα αντίστοιχα σωληνάρια.

3. Διανείμετε 100 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 700 rpm.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
11. Διανείμετε 100 μl ιχνηθέτη αντι-PTH-¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
12. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
13. Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 700 rpm.
14. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
15. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
16. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]).
17. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
18. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
19. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της PTH (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")		303886	100
Βαθμονομητής	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

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης**

Το Όριο Τυφλού (LoB), το Όριο Ανίχνευσης (LoD), καθορίστηκαν σύμφωνα με την οδηγία EP17-A του Ινστιτούτου CLSI.

Το LoB υπολογίστηκε με πολλαπλή μέτρηση του τυφλού δείγματος και υπολογισμούς του 95ου εκατοστημόριου της κατανομής των τιμών της εξέτασης. Το LoB υπολογίστηκε πως είναι 1,7pg/ml.

Το LoD υπολογίστηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στην οδηγία. Το LoD υπολογίστηκε πως είναι 3,8 pg/ml.
- B. Ειδικότητα**

Πεπτίδια που πιθανώς επιδρούν προστέθηκαν σε ένα ορό με υψηλό επίπεδο PTH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της PTH.

Προσθεθείσα αναλύσιμη ουσία σε ορό με χαμηλό επίπεδο PTH			Παρατηρηθέν επίπεδο PTH (pg/ml)	Προσθεθείσα αναλύσιμη ουσία σε ορό με υψηλό επίπεδο PTH			Παρατηρηθ έν επίπεδο PTH (pg/ml)
Τίτλος			43	Τίτλος			444
Κλάσμα hPTH 1-34	2000 pg/ml	42		Κλάσμα hPTH 1-34	2000 pg/ml	443	
-Ω-Κλάσμα hPTH 44-68	100000 pg/ml	44		Κλάσμα hPTH 44-68	100000 pg/ml	448	
Κλάσμα hPTH 73-84	100000 pg/ml	45		Κλάσμα hPTH 73-84	100000 pg/ml	453	
Πρωτεΐνη σχετική με hPTH				Πρωτεΐνη σχετική με hPTH			
Κλάσμα 1-34	100000 pg/ml	42		Κλάσμα 1-34	100000 pg/ml	436	
Τίτλος			11	Τίτλος			880
Κλάσμα hPTH 53-84	100000 pg/ml	18,4		Κλάσμα hPTH 53-84	100000 pg/ml	841	

Αυτό αποδεικνύει ότι η εξέταση hPTH-120 min-IRMA δεν εμφανίζει διασταυρούμενη αντίδραση με κλάσματα hPTH και πρωτεΐνη σχετική με hPTH.

Η απόδοση της δοκιμασίας δεν επηρεάζεται από την αιμόλυση (δοκιμασμένη αιμοσφαιρίνη 2,5 και 5 g/L) και από την χολερυθριναιμία (δοκιμασμένη χολερυθρίνη 0,5 και 1 g/L). Η συζευγμένη χολερυθρίνη (0,5 g/L) και τα τριγλυκερίδια (0,5; 1,0 και 2,5 g/L) δεν παρεμβάλλονται σε αυτόν τον προσδιορισμό.

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Α. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Α. (%)
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

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Α.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ				
Δείγμα	Προσθεθ είσα PTH (pg/ml)	Μετρηθείσες PTH συγκεντρώσεις		Ανάκτηση (%)
		Σύνολο (pg/ml)	Θεωρητική (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%

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
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%

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

Ε. Μεσοδιάστημα

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

	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

F. Effect Hook

Δεν παρατηρήθηκε επίδραση Hook με υψηλή δόση με συγκέντρωση hPTH έως 10000 pg / ml. Ένα δείγμα που έχει προστεθεί με hPTH έως 10000 pg / ml δίνει υψηλότερα cpm από το τελευταίο σημείο βαθμονόμησης

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντι-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία ανών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

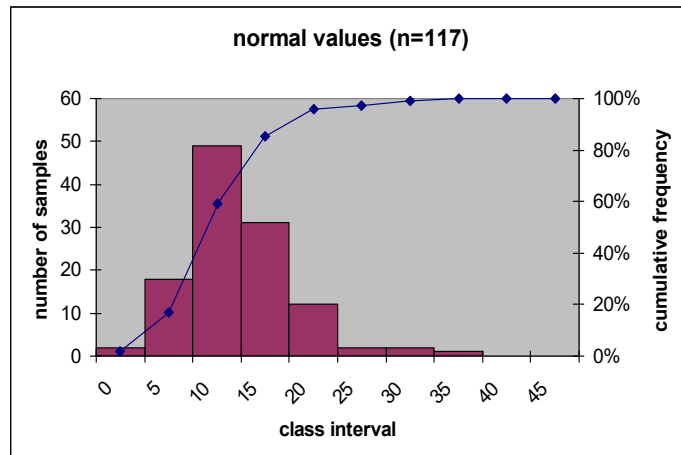
XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XVI. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές παρέχονται πιο κάτω μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Το πεδίο τιμών των επιπέδων της PTH σε 117 φυσιολογικούς ασθενείς (ορό), εκφρασμένο ως ποσοστό επί τοις εκατό 2,5% έως 97,5%, ήταν 6,2 έως 29 pg/ml.



XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μολύβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσεων αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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 SLOPOLSKY 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.

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.

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" ml	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕ Σ ml	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ml
Βαθμονομητές (0-6)	-	0,3	-
Δείγματα, οροί ελέγχου	-	0,1	0,3 0,1
Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης			
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) με ανάδευση στις 700 rpm		
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Ιχνηθέτης	0,1	0,1	0,1
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) με ανάδευση στις 700 rpm		
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Διάλυμα πλύσης	-	2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Η υπηρεσία οργάνων της Diasource το επιβεβαιώνει το kit είναι έγκυρο για χρήση στην πλατφόρμα Stratec Riamat 300. Εάν χρειάζεστε επιπλέον πληροφορίες, παρακαλούμε επικοινωνήστε με το IVDInstrumentation@diasource.be

Przed użyciem zapoznaj się z treścią instrukcji.

hPTH-120 min-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Zestaw immunoradiometryczny do ilościowego oznaczania parathormonu ludzkiego (PTH) w ludzkiej surowicy i osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa zestawu: DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP1491: 96 oznaczeń
- C. Producent: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

W celu uzyskania pomocy technicznej lub informacji odnośnie zamówień prosimy o kontakt:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Parathormon ludzki (hPTH) jest głównym fizjologicznym regulatorem metabolizmu fosfowapniowego. hPTH zwiększa zawartość wapnia w surowicy poprzez oddziaływanie na wątrobę (poprawia reabsorpcję tubularnego Ca^{++} i wydzielanie fosforanów) i kości (stymulując czynności osteoklastyczne i resorpcję kostną). Pośrednio wpływa na wchłanianie Ca^{++} przez jelita poprzez stymulację w nerkach reakcji hydroksylacji w pozycji 1- α hydroksy-witaminy D. Wydzielanie PTH jest kontrolowane stężeniem Ca^{++} z surowicy krwi, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

PTH jest produkowany głównie w komórkach przytarczyc i wydzielany jako 84 aminokwasowa cząsteczka. Parathormon w surowicy krwi występuje jako hormon niezmieniony tzw. „intact (PTH 1-84)”. Jest to główny produkt wykazujący aktywność biologiczną. Cząsteczka ta podlega degradacji (w pozycji między 33-37 aminokwasem). Powstają dwa fragmenty: fragment N-końcowy, aktywny biologicznie, fragment C-końcowy, nieaktywny biologicznie. Fragmenty C-końcowe są usuwane tylko w procesie filtracji w kłębuszkowej, podczas gdy aktywne biologicznie formy: „intact-PTH” i fragment N-końcowy są również metabolizowane w wątrobie oraz w innych tkankach. Biologiczny czas połowicznego rozpadu fragmentów końcowych bardzo znacznie wzrasta u pacjentów z niewydolnością nerek. Oznaczanie „intact-PTH” pozwala ocenić zarówno jego wydzielanie jak i aktywność biologiczną.

B. Zastosowanie kliniczne

Wyznaczanie intact hPTH przy użyciu prezentowanego zestawu typu IRMA znajduje zastosowanie głównie przy diagnozie pierwotnej nadczynności przytarczyc, przez wykazanie podwyższonego poziomu aktywnego PTH w surowicy. Pozwala na udokumentowanie występowania wtórnej nadczynności przytarczyc u pacjentów z niedoborem witaminy D, malabsorpcją jelit lub niewydolnością nerek. W ostatnim przypadku istotny jest przede wszystkim brak interferencji z fragmentami N-końcowymi. Specyficzność oraz wysoka czułość zestawu pozwalają na rozróżnienie niskiego poziomu PTH w surowicy w hipoparatyroidyzmie lub w hiperkalcemii pochodzenia nowotworowego.

IV. ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Zestaw DIIAsource hPTH-120 min-IRMA jest dwustopniowym testem immunoradiometrycznym opartym na separacji próbek opłaszczonych przeciwciałami. Pozwala określić poziom ludzkiego intact PTH (hPTH) w surowicy i osoczu. Kozie przeciwciała swoiste wobec fragmentu 1-34 hPTH (fragment N-końcowy) przytwierdzone są do dolnej wewnętrznej powierzchni plastikowych próbek. Do próbek dodane zostają kalibratory lub próbki. Po 1 godzinie inkubacji, przepłukanie usuwa sporadyczny nadmiar antygenu, fragmentów środkowych oraz C-końcowych.

Dodane zostają przeciwciała monoklonalne znakowane ^{125}I swoiste wobec fragmentu 44-68 hPTH. Po 1 godzinie inkubacji i przepłukaniu promieniotwórczość, która pozostała w próbce odzwierciedla stężenie intact h-PTH. Ten dwustopniowy test IRMA jest wysoce swoisty na intact h-PTH i nie wchodzi w reakcję krzyżową z aktywnymi i nieaktywnymi fragmentami nawet przy dużych stężeniach, tak jak sugeruje HACKENG i in.

V. SKŁAD ZESTAWU

Odczynniki	ilość 96 oznaczeń	kolor odcynnika	Rozcieńczanie			
 Probówki opłaszczone przeciwciałami przeciw PTH (kozie przeciwciała)	2 x 48	biały	gotowe do użycia			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Przeciwciała Anti-PTH- ¹²⁵ I (przeciwciała monoklonalne) w buforze boranowym z kaseina EDTA, azydkiem sodu (< 0,1 %)	Ab	¹²⁵ I	1 fiolka 10,5 ml 680 kBq	czerwony	gotowe do użycia	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator zerowy w osoczu ludzkiej z tymolem i benzamidyna	CAL	0	1 fiolka liofilizat	żółty	Dodać 3,0 ml roztworu do rozcieńczania	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratory 1-6 w osoczu ludzkiej z tymolem i benzamidyna (patrz: dokładne wartości na etykietach fiolek)	CAL	N	5 fiolek liofilizat	żółty	Dodać 2 ml roztworu do rozcieńczania	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Roztwór do rozcieńczania za pomocą EDTA i azydku sodu (< 0,1%)	REC	SOLN	1 fiolka 26 ml	zielony	gotowe do użycia	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Bufor do inkubacji: bufor boranowy z surowicą owczą, EDTA i azydkiem (<0,1%)	INC	BUF	1 fiolka 10.5 ml	niebieski	gotowe do użycia	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Roztwór płuczący (Tween 20 - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 50 ml	Brązowy	Rozcieńczyć 28 x w wodzie destylowanej (użyć mieszałki magnetycznego)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrola 1 i 2 w osoczu ludzkiej z tymolem	CONTROL	N	2 fiolek liofilizat	srebrny	Dodać 2 ml roztworu do rozcieńczania	
CONTROL	N					

Uwaga: Do rozcieńczania surowic używać kalibratora 0.
1 pg kalibratora odpowiada 1 pg NIBSC 95/646..

VI. DODATKOWE MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE

Do wykonania testu są konieczne, a nie dostarczone wraz z zestawem:

- woda destylowana
- mikropipety z końcówkami do dozowania 100 μl , 300 μl , 1 ml, 2 ml i 3ml (zaleca się używanie wykalibrowanych pipet z końcówkami wymiennymi)
- wytrząsarka
- mieszałki magnetyczne
- wytrząsarka do próbek (700 rpm)
- automatyczna strzykawka 5ml (typ Cornwall) do płukania
- system do odciągania płynu (opcjonalny),
- licznik promieniowania gamma (minimalna czułość 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kalibratory:** Do kalibratora zero dodać 3 ml roztworu do rozcieńczania, do pozostałych dodać po 2 ml roztworu do rozcieńczania.
- Kontrola:** Dodać do każdej po 2 ml roztworu do rozcieńczania.
- Roztwór płuczący:** Rozcieńczyć roztwór płuczający: zmieszać 1 część roztworu płuczającego z 27 częściami wody destylowanej (rozcieńczenie 28-krotne). W celu wymieszania użyć mieszałki magnetycznej lub homogenizatora. Pod koniec dnia roboczego nieużyty płyn wylać.

VIII. PRZECHOWYWANIE ORAZ OKRES WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW I PRÓBEK

- Wszystkie odczynniki zestawu przed ich otwarciem i rekonstruowaniem są ważne do końca daty ważności podanej na etykietach. Przechowywać w temperaturze 2-8°C.
- Kalibratory oraz kontrole są bardzo niestabilne, używać natychmiast po ich odtworzeniu, pod wielokrotności próbek zamrażać natychmiast, po czym przechowywać w temp. -20°C przez maksymalnie 3 miesiące. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania próbek.
- Świeżo przygotowany roztwór płuczający należy zużyć tego samego dnia.
- Znacznik przechowywany w oryginalnym opakowaniu w temperaturze 2 do 8°C, szczelnie zamknięty zachowuje swoje właściwości do końca terminu ważności.
- Zmiany wyglądu odczynników zestawu mogą wskazywać na ich rozkład lub niestabilność.

IX. PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

- Surowica i osocze powinny być przechowywane w temp. 2-8°C.
- Jeżeli test nie będzie wykonywany w ciągu 8 godzin, zaleca się zamrożenie próbek w temp. -20°C.
- Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania próbek.
- Użycie osocza (heparyna lub EDTA) zapewnia uzyskanie wyższych wyników niż w przypadku surowicy.

Y (surowica) = 1,01x (osocze EDTA) – 21,54 r = 0,91 n = 6

Y (surowica) = 0,99x (osocze heparynizowane) – 6,14 r = 0,94 n = 10

X. PROCEDURA

- Przestrzeganie następujących zasad zagwarantuje powtarzalność oznaczeń. Nie należy wykonywać testu po upływie daty ważności odczynników. Nie należy łączyć odczynników z różnych zestawów, posiadających inny numer serii. Przed wykonaniem testu składniki zestawu należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Dokładnie wymieszać wszystkie odczynniki oraz próbki poprzez delikatne wytrząsanie. Zapobiegać zanieczyszczeniu odczynników i wody przez drobnoustroje. Stosować wymienne, jednorazowe końcówki do pipet osobne dla każdego odczynnika i dla każdej próbki. Używać wody destylowanej i czystych pojemników. Używać wykalibrowanych pipet w celu zapewnienia precyzji oznaczeń. Do każdego cyklu oznaczeń należy wykonać nową krzywą standardową.

B. Procedura

- Oznaczyć w dubletach próbki opłaszczone dla każdego kalibratora, próby badanej i kontroli. Do oznaczania zliczeń całkowitych oznaczyć dwie zwykłe próbki.
- Wymieszać kalibratory, kontrole i próbki badane na wytrząsarkę typu vortex, po czym dodawać po 300 μl każdego z nich do odpowiednich próbek.
- Dodawać po 100 μl buforu do inkubacji do każdej próbki, łącznie z próbkami dla zliczeń całkowitych.
- Wstrząsnąć delikatnie statywem, aby uwolnić bąbelki powietrza.
- Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (18-25°C) na wytrząsarkę do próbek (700 rpm).
- Odciągnąć płyn z każdej próbki (lub zdekantować) z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych. Należy upewnić się, że plastikowa końcówka odciągacza znajduje się na dnie próbki, w celu odcięcia całego płynu.
- Przepłukać próbki za pomocą 2 ml roztworu płuczającego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych). Unikać spieniania przy pipetowaniu.
- Odciągnąć (lub zdekantować) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych).
- Ponownie przemyć próbki za pomocą 2 ml roztworu płuczającego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych), po czym odciągnąć (lub zdekantować).
- Po ostatnim przepłukaniu pozostawić próbki w pozycji pionowej na dwie minuty, po czym zassać pozostałe krople płynu

11.

Do każdej próbki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 100 µl PTH oznakowanego jodem¹²⁵.
12.

Wstrząsnąć delikatnie statywem, aby uwolnić bąbelki powietrza.
13.

Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (18-25°C) na wytrząsarce do próbek (700 rpm).
14.

Odciągnąć płyn z każdej próbki (lub zdekantować) z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych. Należy upewnić się, że plastikowa końcówka odciągacza znajduje się na dnie próbki, w celu odciągnięcia całego płynu.
15.

Przepłukać próbki za pomocą 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych). Unikać spieniania przy pipetowaniu.
16.

Odciągnąć (lub zdekantować) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych).
17.

Ponownie przemyć próbki za pomocą 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych), po czym odciągnąć (lub zdekantować).
18.

Po ostatnim przepłukaniu pozostawić próbki w pozycji pionowej na dwie minuty, po czym zassać pozostałe krople płynu.
19.

Zliczyć aktywność związaną z próbkami na liczniku promieniowania gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1.

Policzyć wartości średnie z dubletów.
2.

Na papierze o skali półlogarytmicznej lub liniowej wykreślić krzywą dla każdego kalibratora: aktywność c.p.m. (oś rzędnych) względem odpowiednich stężeń PTH (oś odciętych), po czym poprowadzić krzywą wzorcową przez punkty kalibracji, odrzucić wyniki krańcowe.
3.

Odczytać stężenie każdej kontroli i próbki poprzez interpolację na krzywej wzorcowej.
4.

Powyższe obliczenia można uprościć, stosując komputerową redukcję danych. W przypadku użycia automatycznego obliczania wyników, zaleca się wykorzystanie 4-parameterowej funkcji krzywej logistycznej.

XII. PRZYKŁAD TYPOWEJ KRZYWEJ WZORCOWEJ

Poniższe dane są jedynie przykładem i nie powinny być używane w miejsce rzeczywistej krzywej wzorcowej.

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Ilość zliczeń TOTAL		303886	100
Kalibratory	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

XIII. CHARAKTERYSTYKA OZNACZENIA I OGRANICZENIA

A. Granice detekcji

Limit Blank (LoB), limit detekcji (LoD) zostały określone zgodnie z wytycznymi CLSI EP17-A.

LoB obliczono mierząc półfabrykat kilka razy i obliczając 95. percentyl rozkładu wartości testowych. Obliczono, że LoB wynosi 1,7 pg / ml.

LoD obliczono zgodnie z opisem w wytycznej. LoD obliczono na 3,8 pg / ml.

B. Specyficzność

Do surowicy o niskim i wysokim poziomie PTH dodano peptydy dające możliwą interferencję. Zmierzono widoczną reakcję PTH.

Analityt dodany do surowicy o niskim poziomie PTH	Obserwowany poziom PTH (pg/ml)	Analityt dodany do surowicy o wysokim poziomie PTH	Obserwowany poziom PTH (pg/ml)
Brak	43	Brak	444
Fragment 1-34 hPTH 2000 pg/ml	42	Fragment 1-34 hPTH 2000 pg/ml	443
Fragment 44-68 hPTH 100000 pg/ml	44	Fragment 44-68 hPTH 100000 pg/ml	448
Fragment 73-84 hPTH 100000 pg/ml	45	Fragment 73-84 hPTH 100000 pg/ml	453
Białko powiązane z hPTH		Białko powiązane z hPTH	
Fragment 1-34 100000 pg/ml	42	Fragment 1-34 100000 pg/ml	436
Brak	11	Brak	880
Fragment 53-84 hPTH 100000 pg/ml	18.4	Fragment 53-84 hPTH 100000 pg/ml	841

Powyższe dane ukazują, że test hPTH-120 min-IRMA nie wchodzi w reakcję krzyżową z fragmentami hPTH oraz białkiem powiązanym z hPTH.

Na wyniki oznaczenia nie wpływa hemoliza (testowane stężenia hemoglobiny: 2,5 i 5 g/L) ani bilirubinemia (testowane stężenia bilirubiny: 0,5 i 1 g/L). Bilirubina sprzężona (0,5 g/L) ani trójglicerydy (0,5; 1,0 oraz 2,5 g/L) nie wpływają na to oznaczenie.

C. Precyzja

zmienność międzyseryjna				zmienność międzyseryjna			
Surowica	Replikat	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Surowica	Replikat	<X> ± 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: odchylenie standardowe; CV: współczynnik zmienności

D. Dokładność

ODZYSK				
Próbka	Dodane PTH (pg/ml)	Zmierzone stężenia PTH		Odzysk (%)
		Total (pg/ml)	Teoretyczne (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 ROZCIEŃCZANIA

Próbka	Proporcja	Stężenie teoretyczne (pg/ml)	Stężenie zmierzone (pg/ml)	Odzysk (%)
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%

Próbki rozcieńczono za pomocą kalibratora zerowego.

E. Przesunięcie czasowe w trakcie dozowania

Upływ czasu między dodaniem ostatniego kalibratora a dozowaniem próbki nie przekraczający 30 minut nie ma wpływu na wartość wyniku.

CZAS PRZESUNIĘCIA

	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

F. Efekt haka

Nie zaobserwowano wysokiego efektu haczykowego przy stężeniu hPTH do 10000 pg / ml. Próbką wzbogaconą w hPTH do 10000 pg / ml daje wyższe cpm niż ostatni punkt kalibratora.

XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych

wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.

- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo ekspozycyjni na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

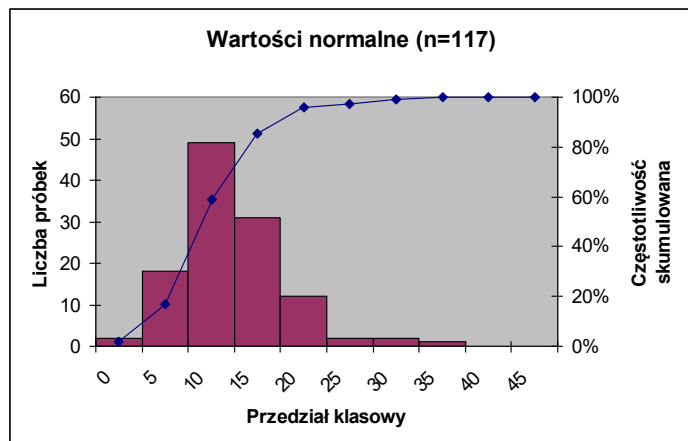
XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki otrzymane dla Kontroli 1 i Kontroli 2 nie mieszczą się w przedziale wartości przedstawionym na fiole, nie wolno ich wykorzystywać do momentu wyjaśnienia zaistniałej sytuacji.
- Jeżeli zajdzie potrzeba, laboratorium może przygotować własne kontrole powstałe po połączeniu wielu surowic. Surowice kontrolne powinny być przechowywane zamrożone w porcjach do jednorazowego użycia.
- Akceptowalna wielkość rozrzutów przy oznaczaniu próbek w dubletach odnosi się do kryteriów Dobrej Praktyki Laboratoryjnej

XVI. ZAKRES NORMY

Każde laboratorium powinno ustalić własne zakresy normy. Normy podane poniżej należy traktować jako wskazówkę

Zakres poziomów PTH u 117 zdrowych pacjentów (surowicy) wyrażony jako 2,5% do 97,5% percentyli wynosił 6,2 do 29 pg/ml.



XVII. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Bezpieczeństwo

Zestaw jest przeznaczony jedynie do diagnostyki in vitro.

Zestaw zawiera ^{125}I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV).

Przestrzeganie podstawowych zasad ochrony radiologicznej gwarantuje bezpieczeństwo.

Produkty radioaktywne mogą być nabywane, otrzymywane, przechowywane i używane jedynie przez osoby do tego upoważnione oraz w laboratoriach posiadających odpowiednią autoryzację. Roztwory w żadnym przypadku nie mogą być podawane ludziom ani zwierzętom.

Zasady stosowania produktów radioaktywnych regulują przepisy danego kraju.

Materiały promieniotwórcze można wykorzystywać w obszarach specjalnie do tego przeznaczonych. Laboratorium powinno prowadzić dziennik przechowywanych materiałów promieniotwórczych. Aparatura laboratoryjna oraz wyroby szklane, które mogą ulec skażeniu przez materiały promieniotwórcze, powinny zostać oddzielone, w celu uniknięcia ich skażenia.

Każdy wyciek radioaktywny należy natychmiast zmyć zgodnie z lokalną procedurą bezpieczeństwa promieniotwórczego. Odpady radioaktywne należy usuwać zgodnie z przepisami prawnymi obowiązującymi w danym państwie. Postępowanie wg podstawowych zasad bezpieczeństwa radioaktywnego zapewnia wystarczającą ochronę.

Odczynniki zestawu zawierające składniki pochodzenia ludzkiego zostały przetestowane licencjonowanymi zestawami (sprawdzone metodami Europejskimi zatwierdzone przez FDA) i wykluczono obecność przeciwciał anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV i antygenu HBs. Mimo to nie ma jednak pełnej gwarancji, że takie składniki nie mogą przenosić żółtaczki, wirusów HIV czy innych infekcji wirusowych – dlatego też zarówno te odczynniki, jak i próbki pacjentów należy traktować jako potencjalne źródło zakażenia.

Składniki pochodzenia zwierzęcego w odczynnikach zestawu, zostały pobrane od zwierząt zdrowych. Składniki pochodzenia wołowego pochodzą z państw, gdzie nie stwierdzono przypadków zarażenia BSE. Mimo to, wszystkie próbki pochodzenia zwierzęcego należy traktować jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu ze skórą jakiegokolwiek z odczynników (azydek sodu jako konserwant). Azydek sodu może reagować z ołowianymi lub miedzianymi rurami, w wyniku czego mogą odkładać się na nich wybuchowe azydki metali. Aby temu zapobiec należy po wylaniu odpadów dobrze przepłukać rury kanalizacyjne.

Nie palić, nie jeść, nie pić ani nie używać kosmetyków w obszarze pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać odzież ochronną i gumowe rękawiczki.

XVIII. 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.

XIX. SCHEMAT PROCEDURY

	LICZBA ZLICZEŃ CAŁKOWITYCH ml	KALIBRATORY ml	PRÓBK(A)I KONTROLE ml
Kalibratory (0-6) Próbki, Kontrole Bufor do inkubacji	- - 0.1	0.3 - 0.1	- 0.3 0.1
inkubacja	1 godzina w temperaturze pokojowej (18-25°C) z wytrząsaniem przy 700 rpm		
Separacja Roztwór płuczący Separacja Roztwór płuczący Separacja	- - - - -	zassać (lub zdekantować) 2.0 zassać (lub zdekantować) 2.0 zassać (lub zdekantować)	
Znacznik	0.1	0.1	0.1
inkubacja	1 godzina w temperaturze pokojowej (18-25°C) z wytrząsaniem przy 700 rpm		
Separacja Roztwór płuczący Separacja Roztwór płuczący Separacja	- - - - -	zassać (lub zdekantować) 2.0 zassać (lub zdekantować) 2.0 zassać (lub zdekantować)	
liczenie aktywności	pomiar próbek przez 60 sekund		

Usługa Instrumentacji Diasource potwierdza to zestaw jest ważny do użycia na platformie Stratec Riamat 300. Jeśli potrzebujesz dodatkowych informacji, skontaktuj się z IVDInstrumentation@diasource.be



Прочетете целия протокол преди употреба

hPTH-120 min-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имунорадиометричен набор за количествено измерване *in vitro* на човешки паратиреоиден хормон (PTH) в серум и плазма.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP1491: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

Човешкият паратиреоиден хормон (hPTH) е основен физиологичен регулатор на калциевия и фосфорен метаболизъм. hPTH увеличава серумните концентрации на калция чрез въздействие върху бъбреците (увеличавайки тубуларната реабсорбция на Ca^{++} и екскрецията на фосфати) и костите (стимулирайки остеокластичната активност и костната резорбция). Той влияе непосредствено върху чревната абсорбция на Ca^{++} чрез стимулиране на бъбречната 1α -хидроксилазия на 25-хидроксивитамин D. Освобождането на PTH се контролира в отрицателна обратна връзка чрез серумните концентрации на Ca^{++} .

PTH се синтезира в главните клетки на паратиреоидните жлези и се секретира като 84 аминокиселинна молекула, наречена "незасегнат PTH", който е основният биологично активен продукт. Тази молекула се разлага чрез протеолитичното разцепване на аминокиселините 33-37 в периферните тъкани до образуването на биологично активни фрагменти с крайна аминова група и биологично неактивни фрагменти с крайна карбоксилова група. Фрагментите с крайна карбоксилова група се отстраняват само чрез гломерулна филтрация, докато биоактивният незасегнат PTH и фрагментите с крайна аминова група се разлагат метаболично в черния дроб и други тъкани. Полуживотът на фрагментите с крайна карбоксилова група се увеличава значително при пациенти с бъбречна недостатъчност. И така, измерването на незасегнатия PTH отразява най-точно хормоналното производство и биологичната активност.

B. Клинично приложение

Измерването на незасегнатия hPTH посредством описания в настоящото набор на IRMA се използва за диагностициране на първичен хиперпаратиреоидизъм чрез откриване на повишени серумни нива на биологично активния PTH. То позволява документиране възникването на вторичен хиперпаратиреоидизъм при пациенти с дефицит на вит. D, чревна малабсорбция или бъбречна недостатъчност. В последния случай липсата на взаимодействие с неактивните фрагменти с крайна карбоксилова група е особено ценна. Специфичността и високата сензитивност на изследването също така дават възможност за диференциране на очевидно ниските серумни нива на PTH при хипопаратиреоидизъм или при индуцирана от тумор хиперкалцемия.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource hPTH-120 min-IRMA представява двуфазно имунорадио-метрично изследване, базирано на сепарация на покрити епруветки. То позволява определяне съдържанието на незасегнат човешки РТН (hPTH) в серума и плазма. Кози антитела специфични за фрагмента 1-34 hPTH (фрагмент с краен N) се имобилизират към долната и вътрешната повърхност на пластмасовите епруветки. Към епруветките се добавят калибратори или проби. След едночасова инкубация случайният излишък на антигени, средно регионални фрагменти и фрагменти с краен С се отстранява чрез измиване. Добавят се натоварени с ¹²⁵I моноклонални антитела, специфични за фрагмента 44-68 hPTH. След едночасова инкубация и измиване остатъчната радиоактивност, свързана към епруветката, отразява концентрацията на незасегнатия h-PTH. Това двуфазно изследване на IRMA е силно специфично за незасегнатия h-PTH и не проявява кръстосана реактивност с активните и неактивните фрагменти дори и във високи концентрации, както предполага и HACKENG et al.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Цветен код	Приготвяне			
 Епруветки, покрити с анти-PTH (кози антитела)	2 x 48	бял	Готов за употреба			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Анти-PTH- ¹²⁵ I (моноклонал- ни антитела) в боратен буфер с волски казеин, ЕДТК, натриев азид (<0.1 %)	Ab	¹²⁵ I	1 флакон 10,5 ml 680 kBq	червен	Готов за употреба	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Нулев Калибратор в човешки плазма с тимол и бензамидин	CAL	0	1 флакон лиофилизира н	жълт	Добавете 3 ml реконституиран разтвор	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Калибратори 1-6 в човешки плазма с тимол и бензамидин (виж точните стойности на етикетите на флаконите)	CAL	N	6 флакона лиофилизира ни	жълт	Добавете 2 ml реконституиран разтвор	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Реконституиран разтвор с ЕДТК и натриев азид (< 0.1%)	REC	SOLN	1 флакон 26 ml	син	Готов за употреба	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Инкубационен буфер: боратен буфер с овчи серум, ЕДТК и азид (<0.1%)	INC	BUF	1 флакон 10,5 ml	зелен	Готов за употреба	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Измиващ разтвор (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 флакон 50 ml	кафяв	Разредете 28x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол	CONTROL	N	2 флакона лиофилизира ни	сребърен	Добавете 2 ml реконституиран разтвор	
CONTROL	N					

Забележка: 1. Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.
2. 1 pg от калибрирания препарат е еквивалентен на 1 pg от NIBSC 95/646.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- Дестилирана вода
- Пипети от: 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2 ml и 3 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- Завихрящ смесител

- Магнитен сепаратор
- Клатещо устройство за епруветки (700 rpm)
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 3 ml реконституиран разтвор, а другия калибратор – с 2 ml реконституиран разтвор.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 2 ml реконституиран разтвор.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 27 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (28x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- Калибраторите и пробите са много нестабилни, използвайте ги непосредствено след реконституирането, замразете ги веднага в аликвоти и ги съхранявайте при -20°C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът и плазмата трябва да се съхраняват при температури 2 – 8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 8 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Плазмата (хепарин и EDTA) осигурява по- високи резултати отколкото серума.

$$Y(\text{серум}) = 0,99x(\text{хепаринизирана плазма}) - 6,14$$
$$Y(\text{серум}) = 1,01x(\text{плазма с EDTA}) - 21,54$$

$$r = 0,94$$
$$r = 0,91$$

$$n = 10$$
$$n = 6$$

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки
Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура (18-25°C) . Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

- B. Процедура**
- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
 - Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 300 µl от всяко в съответните епруветки.
 - Разпределете 100 µl инкубационен буфер във всяка епруветка, с изключение на тези за определяне на общия брой импулси.
 - Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.

5.

Инкубирайте за 1 час при стайна температура (18-25°C) в клетещо устройство за епруветки (700 оборота в минута).
6.

Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7.

Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
8.

Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
9.

Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
10.

След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
11.

Разпределете 100 µl от анти-РТН-¹²⁵I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
12.

Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
13.

Инкубирайте за 1 час при стайна температура (18-25°C) в клетещо устройство за епруветки (700 оборота в минута).
14.

Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
15.

Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
16.

Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
17.

Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
18.

След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
19.

Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1.

Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
2.

На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на РТН и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
3.

Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
4.

Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

hPTH-120 min-IRMA	cpm	В/Т (%)
Общ брой	303886	100
Калибратор		
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

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Граници на откриване

Границата на празна (LoB), лимит на откриване (LoD) са определени в съответствие с CLSI ръководството EP17-A. LoB е изчислена чрез измерване на празната проба няколко пъти и изчисляване на 95-ия процентил от разпределението на стойностите на тестовите. LoB се изчислява на 1.7 pg/ml. Лоуд е изчислен, както е описано в насоката. LoD се изчислява на 3.8 pg/ml.

B. Специфичност

Към серумите с ниско и с високо ниво на РТН бяха добавени пептиди с вероятна кръстосана реактивност. Бе измерена очевидната реакция на РТН.

Добавено аналитично вещество към серума с ниско ниво на РТН	Наблюдавано ниво на РТН (pg/ml)	Добавено аналитично вещество към серума с високо ниво на РТН	Наблюдавано ниво на РТН (pg/ml)
Нищо	43	Нищо	444
hPTH 1-34 фрагмент 2000 pg/ml	42	hPTH 1-34 фрагмент 2000 pg/ml	443
hPTH 44-68 фрагмент100000 pg/ml	44	hPTH 44-68 фрагмент100000 pg/ml	448
hPTH 73-84 фрагмент100000 pg/ml	45	hPTH 73-84 фрагмент100000 pg/ml	453
hPTH-свързан протеин 1-34 фрагмент 100000 pg/ml	42	hPTH-свързан протеин 1-34 фрагмент 100000 pg/ml	436
Нищо	11	Нищо	880
hPTH 53-84 фрагмент 100000 pg/ml	18.4	hPTH 53-84 фрагмент 100000 pg/ml	841

Това показва, че hPTH-120 min-IRMA не проявява кръстосана реактивност с hPTH фрагментите и hPTH-свързания протеин.

Изпълнението на изследването не е повлияно от хемолизата (2,5 и 5 g/L тестван хемоглобин) и билирубинемията (0,5 и 1 g/L тестван билирубин). Билирубиновият конюгат (0,5 g/L) и триглицеридите (0,5; 1,0 и 2,5 g/L) не възпрепятстват изследването.

C. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	N	<X>±S.D. pg/ml	CV (%)	Серум	N	<X>±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 : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ				
Проба	Добавен РТН (pg/ml)	Измерени концентрации на РТН		Възстановяване (%)
		Обща (pg/ml)	Теоретична (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%

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (pg/ml)	Измерена концентрация (pg/ml)	Възстановяване (%)
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%

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

Е. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Закъснение

	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

F. Hook Effect

Не се наблюдава висока доза Hook ефект с hPTH концентрация до 10000 pg / ml. Проба с hPTH до 10000 pg / ml дава по-високи срп от последната калибрационна точка.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (НАМА). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
- Хетерофилните антитела в човешкия серум могат да реагират с реагентните имуноглобулини, смущавайки ин витро имунотестовите. Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофилни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела.
Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изисква допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

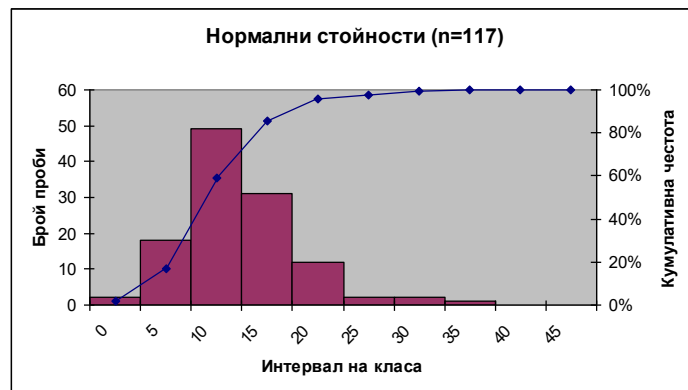
XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XVI. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

Интервалът на нивата на РТН при 117 нормални пациенти (серум), изразен в проценти: от 2,5% до 97,5%, бе 6,2 до 29 pg/ml.



XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

- 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., KLAN S. and SLOPOLSKY 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".

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.

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (И) КОНТРОЛИ ml
Калибратори (0-6)	-	0,3	-
Проби, контроли	-	-	0,3
Инкубационен буфер	-	0,1	0,1
Инкубация	1 час при стайна температура (18-25°C) с разклащане 700 оборота в минута		
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2,0	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2,0	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Трейсър	0,1	0,1	0,1
Инкубация	1 час при стайна температура (18-25°C) с разклащане 700 оборота в минута		
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2,0	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Измиващ разтвор	-	2,0	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Броење	Отчетете епруветките за 60 секунди		

Инструментацията на Diasource потвърждава това комплектът е валиден за използване на платформата Stratec Riamat 300. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля свържете се с

IVDInstrumentation@diasource.be

Тщательно ознакомиться перед использованием.

hPTH-120 min-IRMA

I. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Комплект количественного радиоиммунного анализа для *in vitro* количественных измерений человеческого парашитовидного гормона (ПТГ) в сыворотке и плазме.

II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

A. Патентованное название: DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit

B. Номер по каталогу: KIP1491: 96 тестов

C. Изготовитель: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За технической консультацией или по оформлению заказа обращаться:

Тел: +32 (0)10 84.99.11

Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

A. Биологическая активность

Человеческий парашитовидный гормон (чПТГ) представляет собой важнейший физиологический регулятор фосфорно-кальциевого обмена. ПТГ повышает концентрацию кальция в сыворотке за счет воздействия на почку (улучшая канальцевую реабсорбцию Ca^{++} и выведение фосфора) и кость (стимулируя остеокластическую активность и резорбцию кости). Препарат косвенно влияет на внутреннюю абсорбцию Ca^{++} за счет стимулирования почечной 1α -гидроксиляции 25-гидроксивитамина D. Высвобождение ПТГ контролируется в отрицательной обратной связи концентрацией в сыворотке Ca^{++} .

ПТГ синтезируется в хромофобных клетках парашитовидных желез и выделяется в виде аминокислотной молекулы 84, называемой "интактным ПТГ", являющейся основным биоактивным продуктом. Эта молекула распадается при протеолизе между аминокислотами 33-37 на периферийных участках для формирования биологически активных аминокислотных фрагментов и биологически неактивных карбоксил-границных фрагментов. Карбоксил-границные фрагменты очищаются исключительно клубочковой фильтрацией, а биоактивный интактный ПТГ и аминокислотные фрагменты также метаболически расщепляются в печени и других тканях. Время полужизни карбоксил-границных фрагментов значительно увеличивается у больных с почечной недостаточностью. Т.о., измерение интактного ПТГ наилучшим образом коррелирует с продуцированием гормонов и биологической активностью.

B. Клиническое применение

Измерение интактного ПТГ с помощью набора реактивов IRMA применяется для выявления первичного гиперпаратиреоза за счет демонстрации повышенной концентрации биоактивного ПТГ в сыворотке. Это позволяет регистрировать возникновение вторичного гиперпаратиреоза у больных с дефицитом вит. D, нарушением процессов всасывания в кишечнике или почечной недостаточностью. В последнем случае отсутствие интерференции с неактивными карбоксил-границными фрагментами особенно значимо. Специфичность и высокая чувствительность реагентов позволяет дифференцировать четко выявленные уровни ПТГ сыворотки в гипопаратиреозе или опухолевой гиперкальциемии.

IV. НА ЧЕМ ОСНОВАН МЕТОД

DIAsource hPTH-120 min-IRMA представляет собой двухступенчатый радиоиммунный анализ на основе сепарации в окрашенной пробирке. Это позволяет выявить интактный человеческий ПТГ (чПТГ) в сыворотке и плазме. Козьи антитела, присущие фрагменту 1-34 чПТГ (N-концевой фрагмент), крепятся на нижней внутренней поверхности пластиковой пробирки. В пробирку добавляются калибраторы или образцы. После 1 часа инкубации промывкой удаляются случайные излишки антигена, среднерегионарные и C-концевые фрагменты.

Добавляются моноклональные антитела ¹²⁵I, относящиеся к фрагментам 44-68 чПТГ. После часа инкубации и промывки радиоактивные остатки, налипшие на пробирке, отражают интактные чПТГ концентрации. Этот двухступенчатый метод IRMA является высокоспециализированным для интактного чПТГ и не дает перекрестную реакцию с активными и неактивными фрагментами даже при высоких концентрациях, согласно HACKENG and al.

V. РЕАГЕНТЫ В КОМПЛЕКТЕ

Реагенты	Кол-во 96 тестов	Цветовая маркировка	Раствор для разбавления			
 Пробирки, покрытые анти- ПТГ (козы)	2 x 48	белый	Готово к использованию			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Анти-ПТГ- ¹²⁵ I (моноклональные антитела) в боратном буфере, бычий казеин, ЭДТА и азид натрия (<0.1%)	Ab	¹²⁵ I	1 флакон 10,5 мл 680 кБк	красный	Готово к использованию	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>КАЛ</td><td>0</td></tr></table> Нулевой калибратор в человеческой плазме, тимол и бензамидин	КАЛ	0	1 флакон лиофил.	желтый	Добавить 3 мл растворителя	
КАЛ	0					
<table border="1"><tr><td>КАЛ</td><td>№</td></tr></table> Калибраторы 1-6 в человеческой плазме, тимол и бензамидин (см. точные данные на этикетке)	КАЛ	№	6 флакона лиофил.	желтый	Добавить 2 мл растворителя	
КАЛ	№					
<table border="1"><tr><td>ВСТ.</td><td>РАСТ</td></tr></table> Растворитель с ЭДТА и азидом натрия (<0.1%)	ВСТ.	РАСТ	1 флакон 26 мл	голубой	Готово к использованию	
ВСТ.	РАСТ					
<table border="1"><tr><td>ИНК.</td><td>БУФ.</td></tr></table> Инкубационный буфер: Боратный буфер с овечьей сывороткой, ЭДТА и азидом (<0.1%)	ИНК.	БУФ.	1 флакон 10,5 мл	зеленый	Готово к использованию	
ИНК.	БУФ.					
<table border="1"><tr><td>ПРОМ ЫВ.</td><td>РАСТВ Р.</td><td>КОНЦ НПРТ.</td></tr></table> Промывочный раствор (Твин 20- NaCl)	ПРОМ ЫВ.	РАСТВ Р.	КОНЦ НПРТ.	1 флакон 50 мл	коричневый	Растворить 28 х дистиллированной водой (использовать магнитный смеситель)
ПРОМ ЫВ.	РАСТВ Р.	КОНЦ НПРТ.				
<table border="1"><tr><td>КОНТРОЛ</td><td>№</td></tr></table> Контрольные маркеры 1 и 2 в человеческой плазме с тимолом	КОНТРОЛ	№	2 флакона лиофил.	серебряный	Добавить 2 мл растворителя	
КОНТРОЛ	№					

Примечания: 1. Для разбавления сыворотки использовать нулевой калибровочный маркер.
2. 1 пг приготовления калибратора эквивалентно 1 пг НИБСК 95/646

VI. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Необходимы следующие материалы, отсутствующие в комплекте поставки:
1. Дистиллированная вода

- Пипетки для отмеривания: 100 µl, 300 µl, 1 мл, 2 мл и 3 мл. (рекомендуется использовать точные дозаторы со сменными пластиковыми наконечниками)
- Вортекс-миксер
- Магнитный смеситель
- Шейкер для пробирок (700 об/мин)
- Шприц-автомат 5 мл (тип "корнуол") для промывки
- Аспирационная система (любая)
- Можно использовать любой гамма-счетчик с чувствительностью до ¹²⁵I (мин. производительность 70%).

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

- А. Калибраторы:** Разбавить нулевой калибратор в 3 мл раствора, а другие калибраторы - в 2 мл раствора.
- В. Контрольные образцы:** Разбавить контрольные образцы в 2 мл дистиллированной воды.
- С. Работа с промывочными растворами:** Приготовить достаточный объем рабочего раствора, добавив 27 объемов дистиллированной воды к 1 объему промывочного раствора (28х). Использовать магнитный смеситель для смешивания. Рабочую промывочную жидкость в конце для слить.

VIII. СРОК ГОДНОСТИ И ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

- В закупоренном исходном состоянии все компоненты в комплекте стабильны до завершения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения от 2 до 8°C.
- Калибраторы и контрольные маркеры обладают низкой стабильностью. Использовать немедленно после разведения. Заморозить немедленно и хранить в аликвотах не более 3 месяцев при Т -20°C. - Избегать последующих циклов размораживания и замораживания.
- Свежеприготовленный рабочий раствор для промывки следует использовать в тот же день.
- После первого использования маркер остается стабильным до истечения срока годности при условии хранения в оригинальном герметичном флаконе при Т от 2 до 8°C.
- Физические изменения внешнего вида реагентов могут указывать на нестабильность или разрушение.

IX. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Образцы сыворотки или плазмы хранить при Т 2 - 8°C.
- Если тест в течение 8 часов не осуществлялся, рекомендовано хранить при Т -20°C.
- Избегать последующих циклов размораживания и замораживания.
- Плазма (гепарин и ЭДТА) обеспечивает лучшие результаты по сравнению с сывороткой.

Y (сыворотка) = 1,01 x (плазма с ЭДТА) + 21,54 r = 0,91 n = 6
Y (сыворотка) = 0,99 x (плазма с гепарином) + 6,14 r = 0,94 n = 10

X. ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ

- А. Обращение**
Запрещается использовать компоненты в комплекте после истечения срока годности. Запрещается смешивать материалы из разных комплектов поставки. До начала пользования довести температуру реагентов до комнатной. Тщательно перемешать все реагенты и образцы умеренным взбалтыванием. Во избежание перекрестного загрязнения рекомендуется использовать чистые одноразовые наконечники к пипетке для добавления реагента и образца. Для большей точности рекомендуется использовать высокоточные пипетки или автоматизированное капельное оборудование. Соблюдать инкубационный период. Подготовить градуировочную кривую для каждого сеанса. Не допускается использование данных предыдущего сеанса.
- В. Порядок действий**
 - Пометить окрашенные пробирки контрольного повтора для каждого калибратора, образца и контрольного образца. Для общего подсчета маркировать 2 обычные пробирки
 - Взболтать калибраторы, образцы и контрольные маркеры, и поместить 300 µl каждого в соответствующую пробирку.

3.

Поместить 100 µl инкубационного буфера в каждую пробирку за исключением предназначенных для суммарного подсчета.
4.

Умеренно встряхнуть штатив с пробирками вручную для удаления пузырьков воздуха.
5.

Выдержать 1 минуту при комнатной температуре на шейкере для пробирок (700 об/мин).
6.

Продуть воздухом (или осушить) содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета). Убедиться, что пластиковый наконечник аспиратора достигает донца окрашенной пробирки, и вся жидкость удалена.
7.

Промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета). Избегать вспенивания при добавлении рабочего промывочного раствора.
8.

Продуть воздухом (или осушить) содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета).
9.

Снова промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и осушить воздухом.
10.

После последней промывки оставить пробирки в вертикальном положении на две минуты. Затем продуть оставшуюся влагу.
11.

Добавить 100 µl маркера анти-ПТГ-¹²⁵I в каждую пробирку, включая неокрашенные, для суммарного подсчета.
12.

Умеренно встряхнуть штатив с пробирками вручную для удаления пузырьков воздуха.
13.

Выдержать 1 минуты при комнатной температуре на шейкере для пробирок (700 об/мин).
14.

Продуть воздухом (или осушить) содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета). Убедиться, что пластиковый наконечник аспиратора достигает донца окрашенной пробирки, и вся жидкость удалена.
15.

Промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета). Избегать вспенивания при добавлении рабочего промывочного раствора.
16.

Продуть воздухом (или осушить) содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета).
17.

Снова промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и осушить воздухом.
18.

После последней промывки оставить пробирки в вертикальном положении на две минуты. Затем продуть оставшуюся влагу.
19.

Осуществить подсчет в пробирках гамма-счетчиком в течение 60 секунд.

XI. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА

1.

Рассчитать средний показатель контрольного анализа.
2.

На полулогарифмической или линованной бумаге построить график ц/мин (ордината) для каждого калибратора против соответствующей концентрации ПТГ (абсцисса) и начертить градуировочную кривую через градуировочные точки. Очевидными провалами или всплесками значений можно пренебречь.
3.

Считать показатели концентрации для каждого контрольного маркера и образца за счет интерполяции на градуировочной кривой.
4.

Автоматизированное сведение данных упростит подсчет. Если используется автоматическая обработка результатов, рекомендуется воспользоваться 4-параметрическим логистическим способом припасовывания кривой.

XII. ТИПОВЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные представлены исключительно для иллюстрации. Не допускается их использование когда-либо вместо градуировочной кривой, отображающей реальное время.

hPTH-120 min-IRMA		ц/мин.	В/Т (%)
Общий счет		303886	100
Калибратор	0 пг/мл	365	0,12
	13,3 пг/мл	1402	0,46
	35,8 пг/мл	4314	1,42
	126,0 пг/мл	13688	4,50
	447,0 пг/мл	37113	12,21
	1007,0 пг/мл	71156	23,42
	1562,0 пг/мл	95464	31,41

XIII. ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Пределы обнаружения

Предел бланка (LoB), предел обнаружения (LoD) были определены в соответствии с рекомендациями CLSI EP17-A. LoB был рассчитан путем измерения бланка несколько раз и расчета 95-го перцентиля распределения тестовых значений.

LoB был рассчитан как 1,7 пг / мл. LoD рассчитывали, как описано в руководстве.

LoD был рассчитан как 3,8 пг / мл.

В сыворотку с высоким и низким уровнем ПТГ были добавлены потенциально интерферирующие пептиды. Измерялась эффективная ПТГ-реакция

Исследуемое вещество добавлялось к к сыворотке с низким уровнем ПТГ	Наблюдавшийся уровень ПТГ (пг/мл)	Исследуемое вещество добавлялось к к сыворотке с высоким уровнем ПТГ	Наблюдавшийся уровень ПТГ (пг/мл)
Ничего	43	Ничего	444
Фрагмент чПТГ 1-34 2000 пг/мл	42	Фрагмент чПТГ 1-34 2000 пг/мл	443
Фрагмент чПТГ 44-68 100000 пг/мл	44	Фрагмент чПТГ 44-68100000 пг/мл	448
Фрагмент чПТГ 73-84 100000 пг/мл	45	Фрагмент чПТГ 73-84100000 пг/мл	453
Относящийся к чПТГ белок	42	Относящийся к чПТГ белок	
Фрагмент 1-34 100000 пг/мл		Фрагмент 1-34 100000 пг/мл	436
Ничего	11	Ничего	880
Фрагмент чПТГ 53-84 100000 пг/мл	18,4	Фрагмент чПТГ 53-84 100000 пг/мл	841

Это указывает, что препарат hPTH-120 min-IRMA не вступает в перекрестную реакцию с фрагментами чПТГ и с относящимся к чПТГ белком.

На характеристики реагентов не влияет гемолиз (гемоглобин 2,5 и 5 г/л тест) и билирубинемия (билирубин 0,5 и 1 г/л тест). Билирубина конъюгат (0,5 г/л) и триглицериды (0,5; 1,0 и 2, 5 г/л) с реагентами не реагируют.

C. Точность

ВНУТРИАНАЛИТИЧЕСКАЯ				МЕЖАНАЛИТИЧЕСКАЯ			
Сыворотка	№	<X> ± Ст. Откл. пг/мл	К.В. (%)	Сыворотка	№	<X> ± Ст. Откл. пг/мл	К.В. (%)
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

C.O.: Стандартное отклонение; К.В.: Коэффициент вариации

D. Точность

ТЕСТ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ				
Образец	Добавленный ПТГ (пг/мл)	Измеренные GNU-концентрации		Восстановление (%)
		Общие (пг/мл)	Теоретические (пг/мл)	
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%

ПРОБА НА РАЗБАВЛЕНИЕ

Образец	Разбавление	Теоретич. кнцтр. (пг/мл)	Замеренные кнцтр. (пг/мл)	Восстановление (%)
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%

Образцы разбавлялись нулевым калибратором.

Е. Задержка

Как показано ниже, результаты исследования остаются точными, даже когда образец разбавлялся через 30 минут после добавления калибратора в окрашенные пробирки.

ЗАДЕРЖКА

	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

Г. Эффект Крюка

Эффекта Хук высокой дозы не наблюдалось при концентрации hPTH до 10000 пг / мл. Образец с добавкой hPTH до 10000 пг / мл дает более высокие числа импульсов в минуту, чем в последней точке калибратора.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Материалы, взятые у пациента, получавшего препараты моноклональных антител мыши для диагностики или терапии, могут содержать человеческие антимышинные антитела (НАМА). Такие образцы в результате тестирования с применением комплекта для анализов, содержащего мышинные моноклональные антитела, могут давать как ошибочно завышенные, так и заниженные показатели.
- Нейтрофильные антитела в человеческой сыворотке могут взаимодействовать с реагентом иммуноглобулина, препятствующим нормальному иммунологическому анализу *in vitro*. Пациенты, обычно принимающие продукты, полученные из животных или сыворотки животных, могут быть предрасположены к такому воздействию, и если присутствуют нейтрофильные антитела, не исключаются аномальные показатели. Следует тщательно проверять результаты анализов пациента, у которого, возможно, имеются такие антитела. Если результаты не соответствуют клиническим наблюдениям, тогда для постановки диагноза потребуется дополнительная информация.

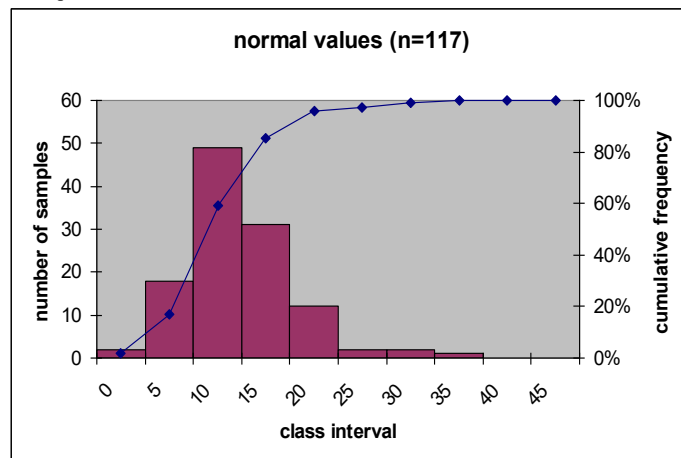
XV. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Если результаты, полученные по контрольному образцу 1 и/или 2 находятся за пределами указаний на этикетке, тогда, если отсутствует удовлетворительное объяснение, такие результаты использовать не допускается.
- Каждая лаборатория может создать собственный комплект контрольных образцов, которые следует хранить в аликвотах замороженными.
- Критерием приемлемого на случай расхождений между контрольными результатами по образцам следует считать усредненную лабораторную практику.

XVI. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

Показатели ниже предлагаются исключительно в виде руководства. Каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный ряд показателей.

Ряд уровней ПТГ у 117 обычных пациентов (сыворотка), выраженный в виде процентиля от 2,5% до 97,5%, составлял от 6,2 до 29 пг/мл.



XVII. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры безопасности

Только для диагностики *in vitro*.

В этом комплекте находится ^{125}I (период полураспада: 60 дней), активная ионизирующая X (28 keV) и γ (35.5 keV) радиация.

К обращению с этим радиоактивным продуктом допускаются только уполномоченные лица. Приобретение, хранение, пользование и обмен радиоактивных продуктов осуществляется в рамках законодательства страны пользователя. Продукт запрещено применять на людях и животных. Обращение с радиоактивным продуктом осуществляется только в специально подготовленных местах в стороне от оживленных участков деятельности. Лаборатория обязана вести журнал регистрации выдачи и хранения радиоактивных материалов. Загрязненное радиоактивными веществами лабораторное оборудование и стеклянную посуду следует содержать отдельно во избежание перекрестного загрязнения различными радиоизотопами.

Любые утечки радиоактивных веществ должны быть немедленно устранены согласно мерам безопасности по обращению с радиоактивными веществами. Утилизация радиоактивных отходов осуществляется согласно местным предписаниям и указаниям лиц, отвечающих за лабораторию. Соблюдение основных правил безопасности по обращению с радиоактивными веществами обеспечивает должный уровень защиты.

Компоненты человеческой крови, включенные в комплект, тестированы согласно утвержденным европейским методам и/или методике Управления по контролю за продуктами и лекарствами FDA. Они признаны негативными для HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Ни один из известных методов не может гарантировать, что производные человеческой крови не переносят гепатит, СПИД или иные инфекции. Таким образом, с образцами реагента, сыворотки или плазмы следует обращаться согласно местным правилам техники безопасности.

Все продукты животного происхождения отбирались только от здоровых животных. Бычьи компоненты отбираются в странах, где ТГЭ не замечена. Однако компоненты с содержанием животных образцов следует рассматривать как потенциально контагиозные.

Избегать контакта участков оголенной кожи с реагентами (азид натрия в качестве антисептика). Азид в комплекте может реагировать со свинцом и медью на пломбировке и, таким образом, создавать взрывоопасные азиды металлов. На этапе промывки раковину следует обильно промывать большим количеством воды во избежание отложения азидов на стенках. Запрещается курить, пить, принимать пищу или накладывать косметику на рабочем месте. Запрещается осуществлять дозировку ртом. Пользоваться защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

XVIII. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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., KLAN S. and SLOPOLSKY 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.

XIX.
СВОДКА ПО ПРОТОКОЛУ

	ОБЩИЙ СЧЁТ мл	КАЛИБРАТОРЫ мл	ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ) КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ мл
Калибраторы (0 - 6) Образцы, контрольные образцы Инкубационный буфер	- - -	0,3 - 0,1	- 0,3 0,1
Инкубация	1 часа при комнатной Т. (18-25°C) ВЗбалтывание при 700 об/мин		
Сепарация Промывочный раствор Сепарация Промывочный раствор Сепарация	- - - - -	Продуть (или осушить) 2,0 Продуть (или осушить) 2,0 Продуть (или осушить)	
Маркер	0,1	0,1	0,1
Инкубация	1 часа при комнатной Т. (18-25°C) ВЗбалтывание при 700 об/мин		
Сепарация Промывочный раствор Сепарация Промывочный раствор Сепарация	- - - - -	Продуть (или осушить) 2,0 Продуть (или осушить) 2,0 Продуть (или осушить)	
Подсчет	Считать пробирки 60 секунд		

Сервис инструментов Diasource подтверждает, что комплект действителен для использования на платформе Stratec Riamat 300. Если вам нужна дополнительная информация, пожалуйста, свяжитесь с IVDInstrumentation@diasource.be