



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
fax 02-92157285
info@listarfish.it
www.listarfish.it



User's Manual

PTH intact ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Intact-PTH (Parathyroid Hormone) in human serum



DE3645



96 wells

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

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

1	NAME AND INTENDED USE	4
2	SUMMARY AND EXPLANATION	4
3	CLINICAL SIGNIFICANCE	4
4	PRINCIPLE OF THE TEST	4
5	KIT COMPONENTS	5
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS	5
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	6
8	REAGENT PREPARATION AND STORAGE	6
9	ASSAY PROCEDURE	6
10	CALCULATION OF RESULTS	8
11	QUALITY CONTROL	9
12	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
13	EXPECTED VALUES	9
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9

1	USO PREVISTO	21
2	RIEPILOGO E SPIEGAZIONE.....	21
3	SIGNIFICATO CLINICO.....	21
4	PRINCIPIO DEL TEST	22
5	COMPONENTI DEL KIT	22
6	AVVERTENZE E PRECAUZIONI	23
7	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE.....	23
8	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE	23
9	PROCEDURA DI ANALISI	24
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	25
11	CONTROLLO QUALITÀ.....	26
12	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA.....	26
13	VALORI PREVISTI.....	27
14	ATTERISTICHE DELLA PROCEDURA.....	27

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	48
--	----

1 NAME AND INTENDED USE

The PTH (Parathyroid) Intact ELISA is intended for the quantitative determination of Intact-PTH (Parathyroid Hormone) in human serum. This assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

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

3 CLINICAL SIGNIFICANCE

Intact PTH assays are important for the differentiation of primary hyperparathyroidism from other (non-parathyroid-mediated) forms of hypercalcemia, such as malignancy, sarcoidosis and thyrotoxicosis². The measurement of parathyroid hormone is the most specific way of making the diagnosis of primary hyperparathyroidism. In the presence of hypercalcemia, an elevated level of parathyroid hormone virtually establishes the diagnosis. In over 90% of patients with primary hyperparathyroidism, the parathyroid hormone will be elevated³. The most common other cause of hypercalcemia, namely hypercalcemia of malignancy, is associated with suppressed levels of parathyroid hormone³ or PTH levels within the normal range⁴. When intact PTH level is plotted against serum calcium, the intact PTH concentration for patients with hypercalcemia of malignancy is almost always found to be inappropriately low when interpreted in view of the elevated serum calcium^{3,4,5}. Unlike C-terminal and midregion PTH, which typically are grossly elevated in subjects with renal insufficiency, intact PTH assays are less influenced by the declining renal function⁵. PTH values are typically undetectable in hypocalcemia due to total hypoparathyroidism, but are found within the normal range in hypocalcemia due to partial loss or inhibition of parathyroid function.

4 PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

Although mid-region and C-terminal fragments are bound by the biotinylated anti-PTH (39-84), only the intact PTH 1-84 forms the sandwich complex necessary for detection. The capacity of the biotinylated antibody and the streptavidin coated microwell both have been adjusted to exhibit negligible interference by inactive fragments, even at very elevated levels. In this assay, calibrators, controls, or patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled antibody and a biotin coupled antibody in a streptavidin-coated microplate well. At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of intact PTH in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of intact PTH present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

5 KIT COMPONENTS

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

5.1 Material and Equipment required but not provided

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

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

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

Although the reagents provided in this kit has been specifically designed to contain no human blood components, the human patient samples, which might be positive for HBsAg, HBCAg or HIV antibodies, must be treated as potentially infectious biohazard. Common precautions in handling should be exercised, as applied to any untested patient sample. Stopping Solution consists of 1 N Sulfuric Acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection, with appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation. If turbidity is observed in any reagent, do not perform assay and please contact your supplier. Various types of shakers with different specifications are commercially available. In the event that the microplate shaker does not fall within the specified range above, each laboratory is encouraged to set their own optimal range.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The determination of Intact PTH should be performed with EDTA plasma or serum. EDTA plasma has been reported to demonstrate improved PTH stability as compared to serum⁶. To assay the specimen in duplicate, 50 µL of serum or EDTA plasma is required. Collect whole blood without anticoagulant or lavender [EDTA] tube. After allowing blood to clot, the serum or plasma should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at -20 °C or lower. Serum samples may be stored up to 8 hours at 2-8 °C. Serum samples frozen at -20 °C are stable for up to 4 months.

8 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

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

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

9 ASSAY PROCEDURE

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

9. Prior to reading, ensure both “blank wells” as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. Blank the plate reader according to the manufacturer’s instructions by using the blank wells.*

Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**.

Read the plate **again** with the reader set to **405 nm** also against distilled or deionized water.

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

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

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

9.1 Procedural Notes

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

10 CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	Intact PTH pg/mL	Intact PTH pg/mL –Result to report
Calibrator A	0.020	0.016	0.018		0
Calibrator B	0.056	0.051	0.054		7
Calibrator C	0.124	0.119	0.122		18
Calibrator D	0.388	0.393	0.391		55
Calibrator E	1.335	1.340	1.338		210
Control 1	0.200	0.200	0.200	27.6	27.6
Control 2	0.804	0.794	0.799	119	119
Patient Sample 1	0.147	0.136	0.142	19.1	19.1
Patient Sample 2	0.407	0.409	0.408	58.5	58.5
Patient Sample 3	2.375	2.454	2.415	> 200	*
Patient Sample 4	3.725	3.725	3.725	> 200	*

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

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

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	Intact PTH pg/mL	Intact PTH pg/mL – Result to report
Calibrator A	0.014	0.008	0.011		0
Calibrator D	0.124	0.128	0.126		55
Calibrator E	0.428	0.425	0.427		210
Calibrator F	1.309	1.317	1.313		700
Control 1	0.074	0.066	0.070	< 200	¶
Control 2	0.260	0.251	0.256	121	π
Patient Sample 1	0.049	0.043	0.046	< 200	¶
Patient Sample 2	0.132	0.133	0.133	< 200	¶
Patient Sample 3	0.758	0.782	0.770	401	401
Patient Sample 4	1.314	1.321	1.318	> 700	←

¶ For samples with readout < 200 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 450 nm as shown in **Sample Data at 450 nm** in the table above. This practice should give the results with optimum sensitivity of the assay.

π Although the readout for Control (2) < 200 pg/mL, it is recommended that the actual result be read out and recorded for quality control evaluation purposes. Further, absorbance for Control 2 is sufficiently high to be analytically valid.

← The absorbance readout is off-scale or higher than the average absorbance of the highest calibrator. Sample should be repeated with dilution.

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

11 QUALITY CONTROL

Control serum or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample should be considered invalid. If the OD 450 nm of Calibrator A after blanking is ≥ 0.100 , the curve is invalid and no patient results should be reported.

12 LIMITATIONS OF PROCEDURE

The PTH (Parathyroid) Intact ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" with samples spiked with 2,100,000 pg/mL of Intact PTH. Samples with intact PTH levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and reassayed for correct values. Like any analyte used as a diagnostic adjunct, intact PTH results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests. Because of the relationship between PTH and calcium in various disorders, PTH results should be interpreted in the context of serum calcium and the patient's clinical history. The PTH (Parathyroid) Intact ELISA will detect non-Intact PTH (1-84) such as PTH fragment (7-84). PTH fragment (7-84) may cause falsely elevated Intact PTH results in patients with abnormal renal function because these patients may have various concentrations of PTH fragment (7-84) in their blood. In patients with abnormal renal function please interpret the Intact PTH results with caution and do not make patient management decisions on the Intact PTH result alone. Supplements containing high biotin levels such as those marketed for hair, skin, and nail benefits, may contain interfering biotin amounts. Biotin levels higher than the recommended daily allowance may cause interference with the assay. Therefore, it is important to communicate with health care providers and patients about biotin intake when collecting samples to prevent incorrect test results. Results show that the highest concentration at which no significant interference was observed is 5 ng/mL of D-Biotin. Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products may contain heterophilic antibodies that react with the reagent antibodies, potentially causing falsely elevated results. This assay has been formulated to mitigate the risk of this type of interference. However, potential interactions between patient sera and test components can occur.

13 EXPECTED VALUES

Intact PTH levels were measured in 148 apparently normal individuals in the U.S. with the PTH (Parathyroid) Intact ELISA. The values obtained ranged from 9.0 to 94 pg/mL for serum. Based on statistical tests on skewness and kurtosis, the population, when transformed logarithmically, follows the normal or Gaussian distribution. The geometric mean + 2 standard deviations of the mean were calculated to be 10.4 to 66.5 pg/mL for serum.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Traceability

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

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

14.2 Accuracy

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

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

14.3 Sensitivity

The sensitivity, or minimum detection limit, of this assay is defined as the smallest single value, which can be distinguished from zero at the 95% confidence limit. The PTH (Parathyroid) Intact ELISA has a calculated sensitivity of 1.57 pg/mL.

14.4 Specificity and Cross-Reactivity

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

To further achieve the specificity of this assay, conjugation and biotinylation and the molar ratios thereof, have been optimized to minimize detection of fragments of PTH. Human PTH 1-34 at levels up to 300 pg/mL and the C-terminal 39-84 fragment at levels up to 300,000 pg/mL give molar cross-reactivities to PTH of less than 2% and 0.02%, respectively. Human PTH 7-84 at level up to 1,000 pg/mL showed 44.5% cross-reactivity.

14.5 Precision and Reproducibility

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

Intra-Assay Variation

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

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

Inter-Assay Variation

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

14.6 Recovery

Various amounts of PTH 1-84 were added to three different patient sera to determine the recovery.

The results are described in the following table:

Serum Sample	PTH Endogenous (pg/mL)	PTH added (pg/mL)	Expected Value (pg/mL)	Measured Value (pg/mL)	Recovery (%)
A	32.7	132	165	168	102%
	20.6	264	285	288	101%
	13.5	396	410	413	101%
B	68.6	132	201	191	95%
	51.7	264	316	344	109%
	45.0	396	441	462	105%
C	19.9	132	152	165	109%
	15.4	264	279	275	99%
	13.3	396	409	424	104%

Average 103%

14.7 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism

Four patient serum samples were diluted with Reagent 3 (the Diluent for Patient Samples read off-scale). Results in pg/mL are shown below:

Sample	Dilution	Expected	Observed	% Observed ÷ Expected
A	Undiluted	-	322	-
	1:2	161	148	92%
	1:4	80.5	73.1	91%
	1:8	40.3	41.5	103%
B	Undiluted	-	230	-
	1:2	115	97	84%
	1:4	58	55	95%
	1:8	29	30	103%
C	Undiluted	-	176	-
	1:2	88	82	93%
	1:4	44	45	102%
	1:8	22	24	109%
D	Undiluted	-	426	-
	1:2	213	192	90%
	1:4	107	90	84%
	1:8	53	47	89%

Average 95%

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

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

1 USO PREVISTO

Il test PTH (Parathyroid) Intact ELISA è volto alla determinazione quantitativa di PTH intatto (ormone paratiroideo) nel siero umano. Questo tipo di analisi è destinato all'impiego diagnostico in vitro.

2 RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

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

3 SIGNIFICATO CLINICO

I test PTH intatto sono importanti per differenziare l'iperparatiroidismo primario da altre forme di ipercalcemia (senza mediazione paratiroidea), quali neoplasie, sarcoidosi e tireotossicosi². La misurazione dell'ormone paratiroideo è il metodo più specifico per formulare la diagnosi di iperparatiroidismo primario. In presenza di ipercalcemia, un livello elevato dell'ormone paratiroideo stabilisce di fatto la diagnosi. L'ormone paratiroideo risulterà elevato³ in una percentuale superiore al 90% dei pazienti affetti da iperparatiroidismo primario. L'altra causa più comune di ipercalcemia, ossia ipercalcemia maligna, è associata a bassi livelli dell'ormone paratiroideo³ oppure a livelli PTH compresi nei limiti normali⁴. Quando il livello di PTH intatto viene raffrontato con il calcio sierico, per i pazienti con ipercalcemia maligna si rileva quasi sempre una concentrazione di PTH intatto eccessivamente bassa, se l'interpretazione avviene alla luce di valori elevati di calcio sierico^{3,4,5}. Diversamente dal PTH C-terminale e della regione medio molecolare, dai valori generalmente molto elevati nei soggetti con insufficienza renale, i test per il PTH intatto sono influenzati in misura minore da una funzione renale ridotta⁵. In genere nell'ipocalcemia i valori PTH non sono rilevabili a causa dell'ipoparatiroidismo totale, tuttavia sono identificabili nella normalità come conseguenza della parziale perdita o dell'inibizione della funzione paratiroidea.

4 PRINCIPIO DEL TEST

Il saggio immunoenzimatico PTH intatto Demeditec è un test ELISA (saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato) a doppio anticorpo per la misurazione della catena di 84 aminoacidi biologicamente intatta del PTH. Due diversi anticorpi policlonali di capra anti-PTH umano sono stati purificati mediante cromatografia per affinità al fine di ottenere una specificità per regioni ben definite della molecola PTH. Un anticorpo biotilinato è preparato per legarsi solo al PTH 39-84 della regione medio molecolare e C-terminale. L'altro anticorpo è preparato per legarsi solo al PTH 1-34 del frammento N-terminale ed è marcato con perossidasi di rafano [HRP].

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

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

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

5 COMPONENTI DEL KIT

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

5.1 Materiali e strumentazione necessari (non in dotazione)

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

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

6 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Benché i reagenti forniti nel presente kit siano stati studiati in modo da non contenere componenti ematiche umane, i campioni di pazienti che potrebbero risultare positivi agli anticorpi HBsAg, HBcAg o HIV devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente infettivo. Osservare le precauzioni standard nella manipolazione dei campioni, analogamente a quanto previsto per i campioni di pazienti non analizzati. La soluzione bloccante è un composto di 1 N acido solforico, un forte acido che, anche se diluito, va trattato con grande cautela, poiché può provocare ustioni. Indossare un paio di guanti, occhiali e indumenti protettivi. Lavare immediatamente eventuali versamenti con abbondanti quantità di acqua. Non respirare i vapori ed evitare di inalarli. Se un reagente appare torbido, non eseguire il test e contattare il fornitore. Sono disponibili in commercio vari tipi di agitatori con specifiche diverse. Qualora l'agitatore per micropiastre non rientri nell'intervallo sopra specificato, il laboratorio dovrà definire il proprio intervallo ottimale.

7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione del PTH intatto deve essere effettuata con plasma o siero EDTA. È stato documentato che il plasma EDTA dimostra una migliore stabilità del PTH rispetto al siero⁶. Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 50 µL di siero o di plasma EDTA. Raccogliere il sangue intero in una provetta senza anticoagulante o lavanda [EDTA]. Lasciare coagulare il sangue, quindi separare tempestivamente il siero o il plasma, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare a una temperatura pari o inferiore a -20 °C. I campioni di siero devono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 8 ore. I campioni congelati a -20 °C sono stabili per un massimo di 4 mesi.

8 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

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

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

9 PROCEDURA DI ANALISI

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

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

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

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

9.1 NOTE SULLA PROCEDURA

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

10 CALCOLO DEI RISULTATI

Metodo di interpolazione della curva:

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

Nota importante:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11 CONTROLLO QUALITÀ

Il siero di controllo ed i pool di siero devono essere analizzati con ciascuna seduta di calibratori e di campioni paziente. I risultati generati dall'analisi dei campioni di controllo devono essere valutati per garantirne l'accettabilità mediante metodi statistici idonei. Nei saggi nei quali uno o più valori dei campioni di controllo qualità sono al di fuori dei limiti accettabili, i risultati per il campione del paziente non devono essere ritenuti validi. Se la densità ottica (OD 450 nm) del calibratore A dopo l'azzeramento è $\geq 0,100$, la curva non sarà valida e pertanto i risultati del paziente dovranno essere esclusi.

12 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il kit PTH (Parathyroid) Intact ELISA non presenta alcun "effetto gancio ad alte dosi" con campioni combinati con 2.100.000 pg/mL di PTH intatto. Tuttavia, i campioni con livelli di PTH intatto superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti e riesaminati per produrre valori corretti. Analogamente a qualsiasi analita impiegato come elemento diagnostico aggiuntivo, i risultati del PTH intatto vanno interpretati con attenzione, all'interno del quadro clinico complessivo e alla luce di altri test diagnostici correlati. A causa del rapporto fra PTH e il calcio in vari disordini, i risultati PTH devono essere interpretati nel contesto del calcio sierico e dell'anamnesi clinica del paziente. Il kit PTH (Parathyroid) Intact ELISA non rileverà il PTH non intatto (1-84) quali i frammenti di PTH (7-84). Un frammento di PTH (7-84) può causare risultati falsamente elevati di PTH intatto in pazienti con funzione renale anomala, perché questi pazienti possono avere nel sangue varie concentrazioni del frammento di PTH (7-84). In pazienti con funzione renale anomala, è opportuno interpretare i risultati di PTH intatto con cautela e non prendere decisioni di gestione del paziente basate unicamente sul risultato di PTH intatto. I supplementi contenenti alti livelli di biotina, come quelli commercializzati per i capelli, la pelle e le unghie, possono contenere una quantità di biotina interferente. Livelli di biotina superiori alla dose giornaliera raccomandata possono interferire con il test ed è pertanto importante discutere con gli operatori sanitari ed i pazienti dell'assunzione di biotina durante la raccolta dei campioni per evitare errori nei risultati. I risultati mostrano che l'interferenza più significativa è stata riscontrata a una concentrazione di D-biotina pari a 5 ng/mL. I campioni prelevati da pazienti abitualmente esposti ad animali o prodotti di siero animale possono contenere anticorpi eterofili che interagiscono con gli anticorpi del reagente e che possono provocare falsi risultati elevati. Questo saggio è stato formulato in modo da ridurre il rischio di un'interferenza di questo genere. È tuttavia possibile che si manifestino potenziali interazioni tra sieri e i componenti del test.

13 VALORI PREVISTI

I livelli di PTH intatto sono stati misurati mediante il test PTH (Parathyroid) Intact ELISA in 148 individui in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti. I valori ottenuti sono compresi tra 9,0 a 94 pg/mL per siero. Sulla base di test statistici di asimmetria e curtosi, la popolazione, una volta trasformata a livello logaritmico, segue la distribuzione normale o gaussiana. La media geometrica e ± 2 deviazioni standard calcolate sono comprese tra 10,4 a 66,5 pg/mL per siero.

14 ATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

14.1 Tracciabilità

I calibratori PTH intatti Demeditec sono tracciabili allo standard internazionale OMS per la preparazione di PTH (1-84) ricombinante (95/646 NIBSC). 1,0 pg/mL = 1,07 pg/mL NIBSC 95/646

14.2 Accuratezza

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

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

14.3 Sensibilità

La sensibilità, o limite di rilevabilità, di questo test è definita come singolo valore minimo diverso da zero a un limite di confidenza del 95%. Il test PTH (Parathyroid) Intact ELISA ha una sensibilità calcolata a 1,57 pg/mL.

14.4 Specificità e reattività incrociata

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

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

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

14.5 Precisione e riproducibilità

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

Variatione intra-saggio

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

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

Variatione inter-saggio

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

14.6 Recupero

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

Campione siero	PTH endogeno (pg/mL)	PTH aggiunto (pg/mL)	Valore previsto (pg/mL)	Valore misurato (pg/mL)	Recupero (%)
A	32,7	132	165	168	102%
	20,6	264	285	288	101%
	13,5	396	410	413	101%
B	68,6	132	201	191	95%
	51,7	264	316	344	109%
	45,0	396	441	462	105%
C	19,9	132	152	165	109%
	15,4	264	279	275	99%
	13,3	396	409	424	104%

Media 103%












14.7 Linearità delle diluizioni del campione paziente: parallelismo

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

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

Media 95%

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
 Via Cavour, 35
 20063 Cernusco S/N (MI)
 telefono 02-92150794
 fax 02-92157285
 info@listarfish.it
 www.listarfish.it