



DCM157-4
Ed. 03/2025

Intact PTH ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica quantitativa dell'Ormone Paratiroideo intatto (PTH) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO157

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Ormone Paratiroideo intatto (PTH) nel siero o plasma umano.

Il kit Intact PTH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Ormone Paratiroideo (PTH) è un ormone sintetizzato nella ghiandola paratiroide in una forma a 115 aminoacidi che, dopo varie modificazioni post-traduzionali, raggiunge la forma biologicamente attiva di 84 aminoacidi (PTH intatto). Il PTH viene rilasciato all'interno del tessuto sanguigno, dove è velocemente degradato (l'emivita è di circa 4 minuti); la concentrazione del PTH intatto nel sangue è regolata tramite un meccanismo a feedback negativo che coinvolge il calcio presente nel siero. Il PTH è degradato all'interno delle ghiandole paratiroidi, nel fegato, nei reni e nelle ossa.

Un'elevata concentrazione di PTH intatto nel tessuto sanguigno può essere indice di una disfunzione renale.

La misura della concentrazione di PTH intatto nel sangue è un test efficace per diagnosticare l'iperparatiroidismo primario e distinguerlo da altre patologie non legate alla paratiroide: infatti il PTH risulta elevato nel 90% dei casi di iperparatiroidismo.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Dia.Metra Intact PTH ELISA misura la concentrazione di PTH nella sua forma biologicamente attiva di 84 aminoacidi (PTH intatto). Il saggio utilizza due anticorpi policlonali diretti contro regioni specifiche e diverse del PTH umano; uno degli anticorpi è biotinilato (e permette il legame del PTH alla micropiastra, attraverso il legame della biotina con la streptavidina coattata nei pozzetti della micropiastra), l'altro è legato a perossidasi di rafano (HRP) (e permette la rilevazione del segnale derivato dalle molecole di PTH catturate).

Il metodo è stato settato per evitare interferenze da parte di frammenti inattivi di PTH: pertanto solamente la forma di 84 aminoacidi (PTH intatto) viene misurata attraverso il dosaggio.

Da un punto di vista procedurale, i Calibratori, i Controlli e il campione sierico dei pazienti sono incubati con entrambi gli anticorpi contemporaneamente all'interno dei pozzetti della micropiastra. Dopo una fase di incubazione (in cui il PTH intatto si lega ai pozzetti della micropiastra attraverso il ponte formato dai due anticorpi), i pozzetti della micropiastra sono lavati con una soluzione di lavaggio per allontanare il materiale non legato. La rilevazione del segnale che quantifica il PTH legato è effettuata attraverso una incubazione con TMB (tetrametilbenzidina) che, reagendo con la perossidasi, produce una colorazione colorimetrica. Tale reazione è fermata attraverso l'aggiunta di Stop Solution, una soluzione di acido solforico.

L'intensità del colore sviluppato è direttamente proporzionale alla quantità di PTH intatto presente nei pozzetti; attraverso una curva di calibrazione, è possibile risalire alla concentrazione esatta di PTH intatto legato.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 0,5 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/15706-0
CAL1	REF DCE002/15707-0
CAL2	REF DCE002/15708-0
CAL3	REF DCE002/15709-0
CAL4	REF DCE002/15710-0
CAL5	REF DCE002/15711-0

2. Controls (2 flacone, 0,5 mL ciascuno)

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi

Control A	REF DCE045/15703A-0
Control B	REF DCE045/15703B-0

3. HRP Conjugate (1 flacone, 7 mL)

Anticorpo policlonale di pecora anti PTH coniugato con perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/15702-0

4. Biotin Conjugate (1 flacone, 7 mL)

Anticorpo policlonale anti PTH di pecora biotinilato

REF DCE019/15719-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra adsorbita con streptavidina

REF DCE002/15703-0

6. **TMB Substrate** (1 flacone, 12 mL)
H₂O₂-TMB (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE004/15704-0
7. **Stop Solution** (1 flacone, 12 mL)
Acido Solforico 1N (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005/15705-0
8. **20X Conc. Wash Solution** (1 flacone, 25 mL)
Soluzione tamponata
REF DCE007/15707-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare.

4. AVVERTENZE

- Questo kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
 - Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
 - Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
 - Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
 - Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
 - Alcuni reagenti (calibratori, controlli e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso.

P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA

PELLE: lavare abbondantemente con acqua

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

Stop solution

Irritazione oculare (categoria 2A); irritazione cutanea (categoria 2)



Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H315 - Provoca irritazione cutanea.

H319 - Provoca grave irritazione oculare.

Consigli di prudenza:

P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua

P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P332 + P313 In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

P337 + P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

P362 + P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di

scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione di Calibratori e Controlli

Calibratori e Controlli sono pronti all'uso.

I Calibratori hanno concentrazioni approssimative di:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	15	30	100	300	1000

I livelli esatti sono riportati nel Certificato di Analisi e nelle etichette per ogni specifico lotto.

Una volta aperti, sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del Campione

La quantificazione del PTH intatto con il presente kit può essere fatta su siero o plasma umano.

Il campione può essere conservato a 2-8°C per 5 giorni; per tempi più lunghi conservare a -20°C, dove il campione è stabile fino a 1 mese.

Evitare cicli di congelamento e scongelamento.

Non utilizzare Sodio Azide come conservante, in quanto in questo dosaggio la Sodio Azide inibisce l'attività dell'enzima HRP.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "20X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:20. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a temperatura ambiente (22-28°C) per 90 giorni.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo e due per ogni Campione.

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo
Campione /Controlli		25 µL
Calibratori C ₀ -C ₅	25 µL	
Biotin Conjugate	50 µL	50 µL
HRP Conjugate	50 µL	50 µL

Coprire la micropiastra ed incubare 90 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) in leggera agitazione (500-600 rpm).

Allontanare la miscela di reazione.

Lavare i pozzetti 4 volte con 300 µL di wash solution diluita.

Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.

Lavaggi automatici: se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.		
TMB Substrate	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C), al riparo dalla luce.		
Stop Solution	50 µL	50 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 630 nm entro 5 minuti.		

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di PTH intatto per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato.

Occorrerebbe compilare delle tabelle di controllo di qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Si suggerisce di utilizzare metodi statistici adeguati per verificare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con le prove precedenti. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento non osservato delle condizioni sperimentali o la degradazione dei reagenti del kit. In questo caso si consiglia di utilizzare reagenti freschi per determinare il motivo delle variazioni.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.
2. Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni.
3. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).
4. Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.
5. Se si ottengono concentrazioni di PTH intatto superiori alla concentrazione del Calibratore 5 (1000 pg/mL), diluire il campione 1:4 con Cal 0 (per esempio: per ottenere 100 µL di campione diluito aggiungere 25 µL del campione originario a 75 µL di Cal 0) e ritestarlo.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Il seguente dato può essere utilizzato come linea guida iniziale:

Range atteso: 9 - 94 pg/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbicante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti sieri. La variabilità intra-assay è ≤ 6,3%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 8,2%.

10.2. Specificità

Gli anticorpi PTH utilizzati in questo metodo sono stati selezionati in modo che il kit Dia.Metra Intact PTH ELISA riconosca i frammenti PTH N-terminali, con la specificità valutata come di seguito:

Frammento	Conc. testata	Cross-reattività
PTH 1-84	1000 pg/mL	100%
PTH 7-84	1000 pg/mL	107%
PTH 1-13	100 ng/mL	0%
PTH 1-34	100 ng/mL	0%
PTH 39-84	1000 ng/mL	0,01%

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di PTH intatto misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,49 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Correlazione

Il kit Dia.Metra Intact PTH ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 110 campioni di siero.

La curva di regressione è :

$$Y = 1,0124 \cdot X + 2,7005$$

$$r = 0,996$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

12. Endres, D.B., Villanueva, R., Sharp, C.F. Jr, Singer, F.R.: Measurement of parathyroid hormone. *Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 18:611-629, 1989.
13. Kao, P.C., van Heerden, J.A., Grant, C.S., Klee, G.G., Khosla S: Clinical performance of parathyroid hormone immunometric assays. *Mayo Clin. Proc.* 67:637-645, 1992
14. Marcus, R.: Laboratory diagnosis of primary hyperparathyroidism. *Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 18:647-658, 1989.

BIBLIOGRAFIA

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

Ed. 03/2025

DCM157-4



DCM157-4
Ed. 03/2025



Intact PTH ELISA

for routine analysis

Quantitative immunoenzymatic determination of intact Parathyroid Hormone (PTH) in human serum and plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO157

INTENDED USE

Colorimetric immunoenzymatic method for quantitative determination of intact Parathyroid Hormone (PTH) concentration in human serum and plasma.

Intact PTH ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Parathyroid Hormone (PTH) is a hormone synthesized in the parathyroid gland in a 115 aminoacids form, that, after post-translational modifications, reaches the biologically active form of 84 amino acids (Intact PTH). PTH is released in the blood, where is rapidly degraded (half-life about 4 minutes); intact PTH concentration in the blood is regulated by a negative feedback mechanism that involves calcium in serum. PTH is degraded inside the parathyroid glands, in liver, kidneys and bones. A high concentration of intact PTH in the blood may indicate kidney dysfunction.

The measurement of the concentration of intact PTH in the blood is an effective way to diagnose the primary hyperparathyroidism and distinguish it from other diseases not related to parathyroid: in fact, intact PTH is elevated in 90% of cases of hyperparathyroidism.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

Dia.Metra Intact PTH ELISA measures the concentration of PTH in its biologically active form of 84 amino acids (intact PTH). The assay uses two polyclonal antibodies directed against specific and different regions of human PTH; one antibody is biotinylated (and allows the binding of intact PTH to the microplate, through the binding of biotin with streptavidin coated in the wells of the microplate), the other antibody is linked to horseradish peroxidase (HRP) (and allows the detection of the signal derived from the molecules of captured intact PTH). This method has been set to avoid interference from inactive fragments of PTH: therefore, only the form of 84 amino acids is measured by the assay.

From a procedural point of view, Calibrators, Controls and the serum samples are incubated with both antibodies simultaneously in the wells of the microplate. After a period of incubation (where intact PTH binds to the wells of the microplate through the bridge formed by the two antibodies), the microplate wells are washed with a wash solution to remove unbound material. The detection of the signal that quantifies the associated intact PTH is accomplished by incubation with TMB (tetramethylbenzidine), that reacts with the peroxidase and produces a colorimetric signal. This reaction is stopped by the addition of Stop Solution, a solution of sulphuric acid. The intensity of the color is directly proportional to the amount of intact PTH present in the wells; through a calibration curve, it is possible to determine the exact concentration of intact PTH bound.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)

CAL0	REF DCE002/15706-0
CAL1	REF DCE002/15707-0
CAL2	REF DCE002/15708-0
CAL3	REF DCE002/15709-0
CAL4	REF DCE002/15710-0
CAL5	REF DCE002/15711-0

2. Controls (2 vial, 0.5 mL each)

See concentration on the Certificate of Analysis

Control A	REF DCE045/15703A-0
Control B	REF DCE045/15703B-0

3. HRP Conjugate (1 vial, 7 mL)

Sheep anti PTH polyclonal antibody, conjugated to horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/15702-0

4. Biotin Conjugate (1 vial, 7 mL)

Sheep anti PTH polyclonal antibody, biotinylated
REF DCE019/15719-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with streptavidin
REF DCE002/15703-0
6. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)
H₂O₂-TMB (avoid any skin contact)
REF DCE004/15704-0
7. Stop Solution (1 vial, 12 mL)
Sulphuric acid 1N (avoid any skin contact)
REF DCE005/15705-0
8. 20X Conc. Wash Solution (1 vial, 25 mL)
Buffered solution
REF DCE007/15707-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 630 nm)

Notes

Store all reagents at 2÷8°C in the dark.

Open the bag of Reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (calibrators, controls and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection.

P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

Stop solution

Eye irritation (Category 2A); Skin irritation

(Category 2)



Warning

Hazard statements:

H315 - Causes skin irritation

H319 - Causes a serious eye irritation

Precautionary statements:

P264 Wash exposed skin thoroughly after handling.

P280 Wear eye protection/face protection. Wear protective gloves.

P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.

Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P332 + P313 If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P337 + P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash before reuse

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels

must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.

- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Calibrators and Controls

Calibrators and Controls are ready to use

The Calibrators have approximate concentrations of:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	15	30	100	300	1000

Exact levels are claimed on the Certificate of Analysis and labels.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample

The determination of intact PTH with this kit can be performed in human serum or plasma.

The samples are stable at 2-8°C for 5 days; store at -20°C for longer time (samples are stable at -20°C for 1 month).

Avoid freezing and thawing cycles.

Do not use Sodium Azide as preservative, because it could inhibit the HRP activity.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "20X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:20 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 90 days at room temperature (22-28°C).

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature..
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample.

Reagent	Calibrator	Sample/Control
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL	
Sample/ Controls		25 µL
Biotin Conjugate	50 µL	50 µL
HRP Conjugate	50 µL	50 µL
Cover the plate and incubate at room temperature (22-28°C) for 90 minutes gently shaking (500-600 rpm). Remove the reaction mixture. Wash the wells 4 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.		
TMB Substrate	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22±28°C).		
Stop Solution	50 µL	50 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 630 nm within 5 minutes.		

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of intact PTH for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied

reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

1. Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.
2. Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration.
3. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).
4. Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.
5. For Intact PTH concentrations greater than the Cal 5 concentration (1000 pg/mL) dilute the sample 1:4 with Cal 0 (for example: to obtain 100 µL of diluted sample mix 25 µL of original sample with 75 µL of Cal 0) and test again.

9. REFERENCE VALUES

The following range can be used as initial guideline:

Expected range: 9 - 94 pg/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of two different sera in one assay. The within assay variability is ≤ 6.3%.

10.1.2. Inter Assay

Between run variation was determined by replicate (16x) the measurement of three different sera in different lots. The between assay variability is ≤ 8.2%.

10.2. Specificity

PTH antibodies used in this method have been selected so that Dia.Metra Intact PTH ELISA kit recognises N-terminal PTH fragments, with the specificity assessed as below:

Fragment	Tested concentration	Cross-reactivity
PTH 1-84	1000 pg/mL	100%
PTH 7-84	1000 pg/mL	107%
PTH 1-13	100 ng/mL	0%
PTH 1-34	100 ng/mL	0%
PTH 39-84	1000 ng/mL	0.01%

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of intact PTH that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.49 pg/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Correlation

Dia.Metra Intact PTH ELISA kit was compared to a commercially available kit. 110 serum samples were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 1.0124 \cdot X + 2.7005$$

$$r = 0.996$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Segre, G.V., Niall H.D., Habener J.F. et. al. : Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance. Am. J. Med. 56: 774,1974.
2. Mallette, L.E., Gagel, R.F.: Parathyroid Hormone and Calcitonin. In: Murray
3. J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 65-69, 1990.
4. Bilezikian, J.P.: Primary Hyperparathyroidism. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 109-111, 1990.
5. Stewart, A.F.: Humoral Hypercalcemia of Malignancy. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 115-118, 1990.
6. Mallette, L.E.: The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action. Endocrin. Rev. 12:110-117, 1991.
7. Kruger, L., Rosenblum, S., Zaazra, J. and Wong,

- J. Intact PTH is stable in unfrozen EDTA plasma for 48 hours prior to laboratory Analysis. Clin. Chem. 41:6: page S47, 1995.
8. Raisz, L.G., Yajnik, C.H., Bockman, R.S., and Bower, B.B.: Comparison of commercially available parathyroid hormone immunoassay in the differential diagnosis of hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism or malignancy. Ann. Intern. Med. 91:739-740, 1979.
 9. Endres, D., Brickman, A., Goodman, W., Maloney, D., and Sherrard, D.: N-Terminal PTH radioimmunoassays in assessment of renal osteodystrophy. Kidney International. 21:132, 1982.
 10. Dambacher, M.A., Fischer, J.A., Hunziker, W.H., et.al.: Distribution of circulating immunoreactive components of parathyroid hormone in normal subjects and in patients with primary and secondary hyperparathyroidism: the role of kidney and of the serum calcium concentration. Clin. Sci. 57:435, 1979.
 11. Kao, P.C., Jiang, N.S., Klee, G.G., and Purnell, D.C.: Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH). Clin. Chem. 28:69, 1982.
 12. Endres, D.B., Villanueva, R., Sharp, C.F. Jr, Singer, F.R.: Measurement of parathyroid hormone. Endocrinol Metab. Clin. North Am. 18:611-629, 1989.
 13. Kao, P.C., van Heerden, J.A., Grant, C.S., Klee, G.G., Khosla S: Clinical performance of parathyroid hormone immunometric assays. Mayo Clin. Proc. 67:637-645, 1992
 14. Marcus, R.: Laboratory diagnosis of primary hyperparathyroidism. Endocrinol Metab. Clin. North Am. 18:647-658, 1989.



DCM157-4
Ed. 03/2025

Intact PTH ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática cuantitativa de Hormona Paratiroidea Intacta (PTH) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO157

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de Hormona Paratiroidea Intacta (PTH) en suero o plasma humano.

El kit Intact PTH ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La Hormona Paratiroidea (PTH) es una hormona sintetizada en la glándula paratiroides en una forma de 115 aminoácidos que, después de varias modificaciones postraduccionales, alcanza la forma biológicamente activa de 84 aminoácidos (PTH intacta). La PTH se libera en el tejido sanguíneo, donde se degrada rápidamente (la vida media es de aproximadamente 4 minutos); la concentración de PTH intacta en la sangre está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa que implica el calcio presente en el suero. La PTH se degrada dentro de las glándulas paratiroides, el hígado, los riñones y los huesos.

Una alta concentración de PTH intacta en el tejido sanguíneo puede indicar disfunción renal.

La medición de la concentración de PTH Intacta en la sangre es una prueba eficaz para diagnosticar el hiperparatiroidismo primario y distinguirlo de otras enfermedades no paratiroideas: de hecho, la PTH es alta en el 90% de los casos de hiperparatiroidismo.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Dia.Metra Intact PTH ELISA mide la concentración de PTH en su forma biológicamente activa de 84 aminoácidos (PTH intacta). El ensayo usa dos anticuerpos policlonales dirigidos contra regiones específicas y diferentes de la PTH humana; uno de los anticuerpos está biotinilado (y permite la unión de PTH a la microplaca, a través de la unión de biotina con estreptavidina revestido en los pocillos de una placa de microtitulación), el otro está unido a peroxidasa de rábano (HRP) (y permite la detección de la señal derivada de las moléculas de PTH capturadas).

El método se estableció para evitar la interferencia de fragmentos de PTH inactivos: por lo tanto, mediante el

ensayo se mide solamente la forma de 84 aminoácidos (PTH intacta).

Procedimiento: los calibradores, los controles y la muestra de suero del paciente se incuban con ambos anticuerpos simultáneamente dentro de los pocillos de microtitulación. Después de un período de incubación (en la que la PTH intacta se une a los pocillos de la microplaca a través del puente formado por los dos anticuerpos), los pocillos de la microplaca se lavan con una solución de lavado para eliminar el material no unido. La detección de la señal que cuantifica la PTH asociada se lleva a cabo a través de la incubación con TMB (tetrametilbenzidina), por reacción con la peroxidasa produce una tinción colorimétrica. Esta reacción se detiene mediante la adición de Stop Solution, una solución de ácido sulfúrico.

La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de PTH intacta presente en los pocillos; a través de una curva de calibración, es posible rastrear la concentración exacta de PTH intacta.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 0,5 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/15706-0
CAL1	REF DCE002/15707-0
CAL2	REF DCE002/15708-0
CAL3	REF DCE002/15709-0
CAL4	REF DCE002/15710-0
CAL5	REF DCE002/15711-0

2. Controles (2 frascos, 0,5 mL cada uno)

Control A	REF DCE045/15703A-0
Control B	REF DCE045/15703B-0

La concentración del Control se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis)

3. Conjugado HRP (1 frasco, 7 mL)

Anticuerpo policlonal anti PTH de oveja conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) REF DCE002/15702-0

4. Conjugado biotina (1 frasco, 7 mL)

Anticuerpo policlonal anti PTH de oveja biotinilado

REF DCE019/15719-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/15703-0

6. Substrato TMB (1 frasco, 12 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004/15704-0

7. Solución de parada (1 frasco, 12 mL)

Ácido sulfúrico 1N (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005/15705-0

8. Solución de lavado conc. 20X (1 frasco, 25 mL)

Tampón

REF DCE007/15707-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos (calibradores, control y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara.

P302 + P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Solución de parada

Irritación ocular (categoría 2A); irritación cutáneas (categoría 2)



Atención

Indicaciones de peligro:

H315 - Provoca irritación cutánea

H319 - Provoca irritación ocular grave

Consejos de prudencia:

P264 – Quitar las prendas contaminadas. Lavare accuratamente ... dopo l'uso.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara.

P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad.

Proseguir con el lavado. P332 + P313 En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P337 + P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P364 Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato como la solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores y Controles

Los calibradores y controles están listos para usar.

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones aproximadas:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	15	30	100	300	1000

Los niveles exactos se indican en el certificado de análisis (Certificate of Analysis) y en las etiquetas para cada lote específico.

Una vez abiertos, Calibradores y Controles permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación de la muestra

La determinación de PTH Intacto con este kit se puede realizar en suero y plasma humano.

La muestra puede almacenarse a 2-8°C durante 5 días; para períodos más largos, almacenar a -20°C, donde la muestra es estable hasta 1 mes.

Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

No use azida sódica como conservante, ya que en este ensayo la azida sódica inhibe la actividad de la enzima HRP.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluya el contenido de cada vial de "Solución de lavado Conc. 20X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes más pequeños, respete la proporción de dilución de 1:20. La solución de lavado diluida es estable a temperatura ambiente (22-28°C) durante 90 días.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra.

Reactivo	Calibrad.	Muestra/ Control
Muestra/ Controles		25 µL
Calibradores C ₀ -C ₅	25 µL	
Conjugado biotina	50 µL	50 µL
Conjugado HRP	50 µL	50 µL
Cubra la microplaca y incubar 90 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C) en agitación (500-600 rpm). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 4 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.		
Substrato TMB	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.		
Solución de parada	50 µL	50 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 630 nm entre 5 minutos.		

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de PTH Intacto para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

1. Calcular la extinción media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.
2. Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores (C₀-C₅).
3. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).
4. Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.
5. Si la muestra está fuera de la curva de calibración, diluya la muestra 1: 4 con Cal 0 (por ejemplo: para obtener 100 µL de muestra diluida, agregue 25 µL de la muestra original a 75 µL de Cal 0) y vuelva a analizarla.

9. VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes datos pueden usarse como una guía inicial:

Rango de normalidad: 9 - 94 pg/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) dos niveles diferentes de muestra. La variabilidad dentro del ensayo es ≤ 6,3%.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de muestra con kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es ≤ 8,2%.

10.2 Especificidad

Los anticuerpos PTH utilizados en este método se han seleccionado de modo que el kit Dia.Metra Intact PTH ELISA reconozca los fragmentos de PTH N-terminales, con la especificidad evaluada como se indica a continuación:

Fragmento	Conc. probabda	Reactividad cruzada
PTH 1-84	1000 pg/mL	100%
PTH 7-84	1000 pg/mL	107%
PTH 1-13	100 ng/mL	0%
PTH 1-34	100 ng/mL	0%
PTH 39-84	1000 ng/mL	0,01%

10.3 Sensibilidad

La concentración mínima de PTH Intacto detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,49 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4 Correlación

El kit Dia.Metra Intact PTH ELISA fue comparado con otro ensayo comercial. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron 110 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal.

$$y = 1,0124x + 2,7005$$

$$r = 0,996$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

primary hyperparathyroidism or malignancy. Ann. Intern. Med. 91:739-740, 1979.

9. Endres, D., Brickman, A., Goodman, W., Maloney, D., and Sherrard, D.: N-Terminal PTH radioimmunoassays in assessment of renal osteodystrophy. Kidney International. 21:132, 1982.
10. Dambacher, M.A., Fischer, J.A., Hunziker, W.H., et.al.: Distribution of circulating immunoreactive components of parathyroid hormone in normal subjects and in patients with primary and secondary hyperparathyroidism: the role of kidney and of the serum calcium concentration. Clin. Sci. 57:435, 1979.
11. Kao, P.C., Jiang, N.S., Klee, G.G., and Purnell, D.C.: Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH). Clin. Chem. 28:69, 1982.
12. Endres, D.B., Villanueva, R., Sharp, C.F. Jr, Singer, F.R.: Measurement of parathyroid hormone. Endocrinol Metab. Clin. North Am. 18:611-629, 1989.
13. Kao, P.C., van Heerden, J.A., Grant, C.S., Klee, G.G., Khosla S: Clinical performance of parathyroid hormone immunometric assays. Mayo Clin. Proc. 67:637-645, 1992
14. Marcus, R.: Laboratory diagnosis of primary hyperparathyroidism. Endocrinol Metab. Clin. North Am. 18:647-658, 1989.

BIBLIOGRAFÍA

1. Segre, G.V., Niall H.D., Habener J.F. et. al. : Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance. Am. J. Med. 56: 774, 1974.
2. Mallette, L.E., Gagel, R.F.: Parathyroid Hormone and Calcitonin. In: Murray
3. J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 65-69, 1990.
4. Bilezikian, J.P.: Primary Hyperparathyroidism. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 109-111, 1990.
5. Stewart, A.F.: Humoral Hypercalcemia of Malignancy. In: Murray J.F. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 115-118, 1990.
6. Mallette, L.E.: The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action. Endocrin. Rev. 12:110-117, 1991.
7. Kruger, L., Rosenblum, S., Zaazra, J. and Wong, J. Intact PTH is stable in unfrozen EDTA plasma for 48 hours prior to laboratory Analysis. Clin. Chem. 41:6: page S47, 1995.
8. Raisz, L.G., Yajnik, C.H., Bockman, R.S., and Bower, B.B.: Comparison of commercially available parathyroid hormone immunoassay in the differential diagnosis of hypercalcemia due to

Ed. 03/2025

DCM157-4

	DE <i>In vitro</i> Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> FR Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> EN <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> PT Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par EN Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement EN Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication EN Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) EN Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique EN Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi EN Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot EN Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests EN Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret EN Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation EN Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue EN Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil EN Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		