



hPTH-120 min-IRMA

KIP1491

Read entire protocol before use.

hPTH-120 min-IRMA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP1491: 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological Activity

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

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

B. Clinical Application

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIIAsource hPTH-120 min-IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated-tube separation. It allows the determination of intact human PTH (hPTH) in serum. Goat antibodies specific to the 1-34 hPTH fragment (N-terminal fragment) are attached to the lower and inner surface of the plastic tubes. Calibrators or samples are added to the tubes. After 1 hour incubation, washing removes the occasional excess of antigen, mid-regional and C-terminal fragments. ¹²⁵I labelled monoclonal antibodies specific to the 44-68 hPTH fragment are added. After 1 hour incubation and washing the remaining radioactivity bound to the tube reflects the intact h-PTH concentration. This two-step IRMA is highly specific of the intact h-PTH and does not cross react with active and inactive fragments even at high concentrations as suggested by HACKENG and al.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity 96 tests	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti PTH (goat antibodies)	2 x 48	white	Ready for use
Ab¹²⁵I Anti-PTH- ¹²⁵ I (monoclonal antibodies) in Borate Buffer with bovine casein, EDTA, sodium azide (<0.1 %)	1 vial 10.5 ml 680 kBq	red	Ready for use
CAL0 Zero Calibrator in human serum with thymol and benzamidin	1 vial lyophil.	yellow	Add 3 ml reconstitution solution
CALN Calibrators 1-6 in human serum with thymol and benzamidin (see exact values on vial labels)	6 vials lyophil.	yellow	Add 2 ml reconstitution solution
REC SOLN Reconstitution solution with EDTA and sodium azide (< 0.1%)	1 vial 26 ml	blue	Ready for use
INC BUF Incubation Buffer: Borate Buffer with sheep serum, EDTA and azide (<0.1%)	1 vial 10.5 ml	green	Ready for use
WASH SOLN CONC Wash solution (Tween 20-NaCl)	1 vial 50 ml	brown	Dilute 28x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROLN Controls 1 and 2 in human serum with thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 2 ml reconstitution solution

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

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 3 ml reconstitution solution and the other calibrators with 2 ml reconstitution solution.
- Controls** : Reconstitute the controls with 2 ml reconstitution solution.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 27 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (28x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- § Serum and plasma must be kept at 2 – 8°C.
- § If the test is not run within 8 hours, storage at -20°C is recommended.
- § Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- § Plasma (heparin and EDTA) provides higher results than serum.

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

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

X. PROCEDURE

- Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- Procedure**
 - Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
 - Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 300 µl of each into the respective tubes.
 - Dispense 100 µl Incubation Buffer in each tube except those for total counts.
 - Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
 - Incubate for 1 hour at room temperature on a tube shaker (700 rpm).
 - Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
 - Wash the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
 - Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
 - Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate (or decant).
 - After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
 - Dispense 100 µl of anti-PTH-¹²⁵I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
 - Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
 - Incubate for 1 hour at room temperature on a tube shaker (700 rpm).
 - Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated-tube in order to remove all the liquid.
 - Wash the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
 - Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).

17. Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate (or decant).
18. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
19. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

XII. TYPICAL DATA

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		237132	100
Calibrator	0 pg/ml	723	0.3
	7.4 pg/ml	1011	0.4
	12.9 pg/ml	1554	0.7
	36.5 pg/ml	3949	1.7
	116 pg/ml	9697	4.1
	396 pg/ml	31685	13.4
	973 pg/ml	54558	23.0

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 4.1 pg/ml.

B. Specificity

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

Added analyte to a low PTH level serum		Observed PTH level (pg/ml)	Added analyte to a high PTH level serum		Observed PTH level (pg/ml)
Nothing		43	Nothing		444
hPTH 1-34 fragment	2000 pg/ml	42	hPTH 1-34 fragment	2000 pg/ml	443
hPTH 44-68 fragment	100000 pg/ml	44	hPTH 44-68 fragment	100000 pg/ml	448
hPTH 73-84 fragment	100000 pg/ml	45	hPTH 73-84 fragment	100000 pg/ml	453
hPTH-related protein			hPTH-related protein		
1-34 fragment	100000 pg/ml	42	1-34 fragment	100000 pg/ml	436
Nothing		11	Nothing		880
hPTH 53-84 fragment	100000 pg/ml	18.4	hPTH 53-84 fragment	100000 pg/ml	841

This demonstrates that the hPTH-120 min-IRMA does not cross react with hPTH fragments and hPTH-related protein.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	50.7 ± 2.1	4.2	C	20	95.9 ± 6.3	6.6
B	10	233 ± 7	2.8	D	20	342 ± 11	3.2

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Added PTH (pg/ml)	Recovered PTH (pg/ml)	Recovery (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
1	1/1	-	711.9
	1/2	356.0	363.5
	1/4	178.0	185.0
	1/8	89.0	86.7
	1/16	44.5	39.9
	1/32	22.2	20.2
	1/64	11.1	9.8
2	1/1	-	532.7
	1/2	266.4	270.9
	1/4	133.2	137.4
	1/8	66.6	72.6
	1/16	33.3	32.6
	1/32	16.6	18.4
	1/64	8.3	9.4

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time Delay

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

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

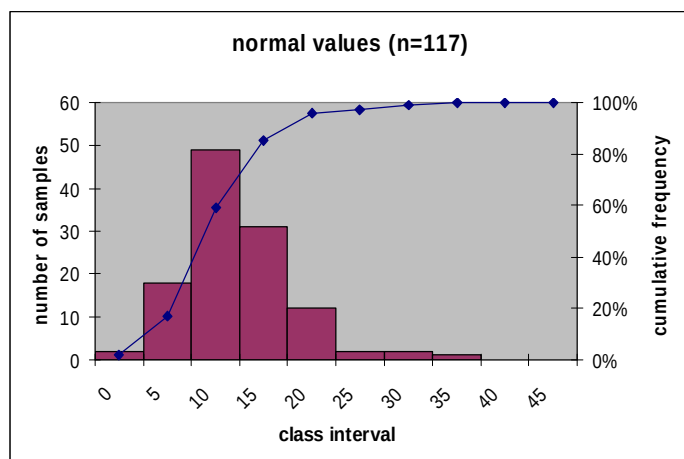
XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XV. REFERENCE INTERVALS

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

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



XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

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

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIAsource Catalogue Nr : KIP1491	P.I. Number : 1700531/en	Date of issue : 090821/1
-------------------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Revision date : 2009-08-21

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hPTH-120 min-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP1491 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

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

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

B. Applications cliniques

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

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource hPTH-120 min-IRMA est une trousse immunoradiométrique à deux phases basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Elle rend possible la détermination de la PTH humaine intacte (hPTH) dans le sérum. Des anticorps de chèvre, spécifiques pour le fragment 1-34 hPTH (fragment N-terminal) sont attachés à la surface basse et interne des tubes en plastique. Les calibrateurs ou les échantillons sont ajoutés aux tubes. Après une heure d'incubation, un lavage enlève les éventuels fragments d'antigène, mi-régionaux et C-terminaux superflus. Des anticorps monoclonaux marqués avec du ¹²⁵I, spécifiques pour le fragment 44-68 hPTH, sont ajoutés. Après une heure d'incubation et un lavage, la radioactivité restante liée à la tube indique la concentration en h-PTH intacte. Cette trousse IRMA à deux phases est très spécifique pour la h-PTH intacte et ne présente pas de réaction croisée avec des fragments actifs et inactifs, même à des concentrations élevées comme indiqué par HACKENG et al.

V. REACTIFS FOURNIS

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

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

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de tubes (700 rpm)
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages

- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 3 ml de solution de reconstitution et les autres calibrateurs avec 2 ml de solution de reconstitution.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 2 ml de solution de reconstitution.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 27 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (28x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 8 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Le plasma(Héparine et EDTA) donne des résultats plus élevés que le sérum.
Y(sérum) = 1,01 x (plasma EDTA) – 21,54 r=0,91 n=6
Y(sérum) = 0,99 x (plasma héparine) – 6,14 r=0,94 n=10

X. MODE OPERATOIRE

- Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

- Mode opératoire**
 - Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
 - Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 300 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
 - Distribuer 100 µl de Tampon d'Incubation dans chaque tube, à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale.
 - Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
 - Incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation continue (700 rpm).
 - Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
 - Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.

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

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

XII. DONNEES TYPES

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		237132	100
Calibrateur	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

- A. Sensibilité
- Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 4,1 pg/ml.

- B. Spécificité

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

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

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

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	PTH ajoutée (pg/ml)	PTH récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
2	1/64	11,1	9,8
	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

Les échantillons ont été dilué avec le calibrateur zéro.

- E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon
- Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

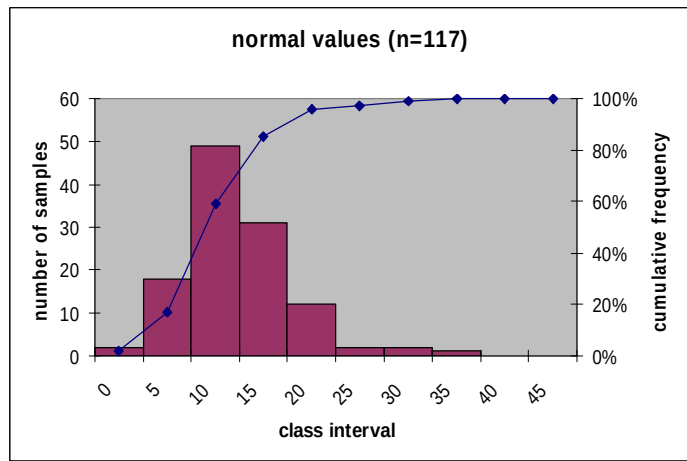
DELAÏ					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

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



XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de ¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

Numéro de catalogue DIAsource: KIP1491	Numéro de P.I.: 1700531/fr	Numéro de révision : 090821/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Lees het hele protocol vóór gebruik.

hPTH-120 min-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

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

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. Gedeponiseerd handelsmerk:** DIAsource hPTH-120 min-IRMA kit
- B. Catalogusnummer:** KIP1491: 96 testen
- C. Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:
Tel.: +32 (0)67 88 99 99 - Fax: +32 (0)67 88 99 96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische werkingsmechanismen

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

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

B. Klinische toepassing

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

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

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

V. GELEVERDE REAGENTIA

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

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

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2 ml en 3 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigstelsysteem (facultatief).
- Schudder voor de buisjes (700 rpm).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

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

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

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

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

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

X. PROCEDURE

- A. Opmerkingen bij de procedure**
Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

- B. Procedure**
- Etiketeer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketeer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
 - Vortex de kalibrators, controles en monsters gedurende korte tijd en pipetteer 300 µl van elk in de desbetreffende buis.
 - Pipetteer 100 µl van de Incubatiebuffer in elke buis met uitzondering van de totaal tellingen.
 - Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
 - Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (700 rpm).
 - Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
 - Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
 - Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
 - Was de buizen opnieuw met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
 - Na de laatste wassing, laat de buizen gedurende twee minuten rechtop staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
 - Pipetteer 100 µl van anti-PTH-¹²⁵I van de tracer in elke buis, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaal tellingen.
 - Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.

13. Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (700 rpm).
14. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
15. Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
16. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
17. Was de buizen opnieuw met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
18. Na de laatste wassing, laat de buizen gedurende twee minuten rechtop staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
19. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

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

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		237132	100
Kalibrator	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

- A. Detectielimiet
- Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 4,1 pg/ml.
- B. Specificiteit
- Mogelijk interfererende peptiden werden toegevoegd aan een serum met een laag en met een hoog PTH-gehalte. De bijhorende respons van PTH werd gemeten.

Toegevoegd reagens aan een serum met een laag PTH-gehalte	Vastgesteld PTH-gehalte (pg/ml)	Toegevoegd reagens aan een serum met een hoog PTH-gehalte	Vastgesteld PTH-gehalte (pg/ml)
Niets	43	Niets	444
hPTH 1-34 fragment 2000 pg/ml	42	hPTH 1-34 fragment 2000 pg/ml	443
hPTH 44-68 fragment 100000 pg/ml	44	hPTH 44-68 fragment 100000 pg/ml	448
hPTH 73-84 fragment 100000 pg/ml	45	hPTH 73-84 fragment 100000 pg/ml	453
hPTH-gerelateerd proteïne 1-34 fragment 100000 pg/ml	42	hPTH-gerelateerd proteïne 1-34 fragment 100000 pg/ml	436
Niets	11	Niets	880
hPTH 53-84 fragment 100000 pg/ml	18,4	hPTH 53-84 fragment 100000 pg/ml	841

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

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST			
Monster	Toegevoegd PTH (pg/ml)	Recovery van PTH (pg/ml)	Recovery (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

VERDUNNINGSTEST			
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (pg/ml)	Concentratie die bepaald werd (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
	1/64	11,1	9,8
2	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

De monsters zijn verdund met de nulkalibrator.

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

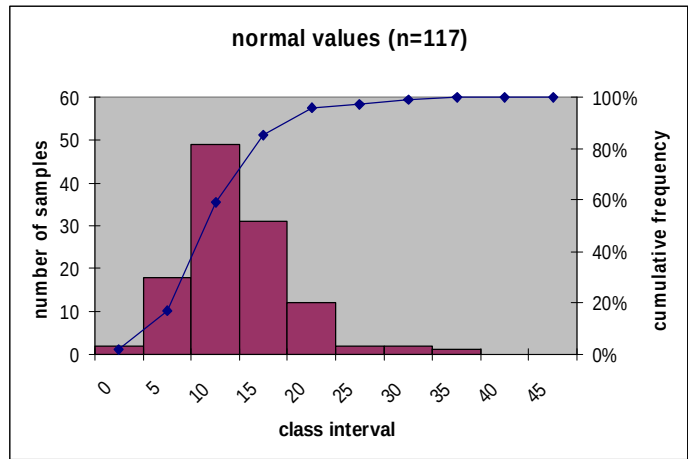
TIJDSPANNE					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

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

XV. REFERENTIE-INTERVALS

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



XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid
Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt.
Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.
Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.
Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.
De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.
Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.
Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.
Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

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

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

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

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

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

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

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

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

DIAsource catalogusnummer: KIP1491	Nummer van de bijsluiter: 1700531/nl	Revisienummer: 090821/1
---------------------------------------	---	----------------------------



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hPTH-120 min-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1491 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivitäten

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

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

B. Klinische Anwendung

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hPTH-120 min-IRMA ist ein Zwei-Schritt immunradiometrischer Assay in beschichteten Röhrchen. Er ermöglicht die Bestimmung von intaktem humanem PTH (hPTH) in Serum. Ziegen-Antikörper, die für das 1-34 hPTH Fragment (N-terminales Fragment) spezifisch sind, werden unten und innen an den Kunststoffröhrchen angebracht. Kalibratoren oder Proben werden in die Röhrchen zupipettiert. Nach einer Inkubation von 1 Stunde werden eventuelle Überschüsse von Antigen, mittelregionalen und C-terminalen Fragmenten abgewaschen.

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

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

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

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 3 ml Rekonstitutionslösung, die anderen Kalibratoren mit 2 ml Rekonstitutionslösung.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml Rekonstitutionslösung.
- C. **Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (28x) mit 27 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Die Kalibratoren und Kontrollen sind sehr instabil, sie sind sofort nach Rekonstitution zu verwenden, sofort aliquot einzufrieren und bei -20°C höchstens 3 Monate zu lagern. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- und Plasmaproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 8 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiten Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Serum- oder Plasmaproben (EDTA und heparinisiertes) liefern ähnliche Ergebnisse.
Y(Serum) = 1,01 x (EDTA Plasma) – 21,54 r=0,91 n=6
Y(Serum) = 0,99 x (heparinisiertes Plasma) – 6,14 r=0,94 n=10

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

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

14.

Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
15.

Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
16.

Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
17.

Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
18.

Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
19.

Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1.

Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2.

Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration PTH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3.

Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
4.

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

XII. TYPISCHE WERTE

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		237132	100
Kalibrator	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

- A.

Nachweisgrenze

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

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 4,1 pg/ml.
- B.

Spezifität

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

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

Das beweist, dass der hPTH-120 min-IRMA keine Kreuzreaktion mit hPTH Fragmenten und hPTH-bezogenem Protein aufweist.

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

Probe	Zugeg. PTH (pg/ml)	Wiedergef. PTH (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (pg/ml)	Gemess. Konzent. (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
	1/64	11,1	9,8
2	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.

- E.

Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

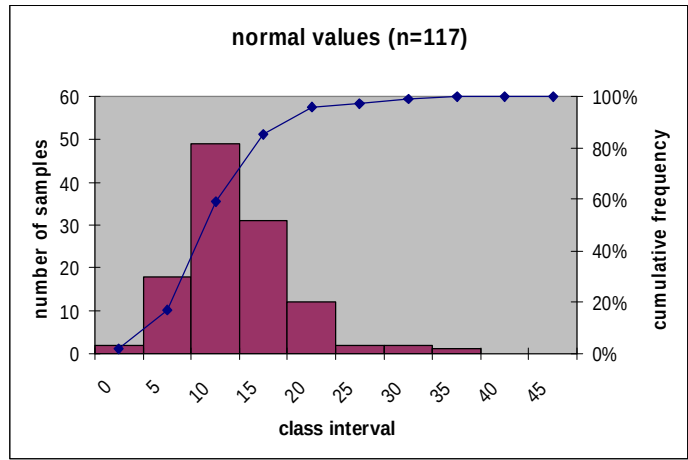
ZEITABSTAND					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Der Bereich der PTH-Werte bei 117 gesunden Patienten, ausgedrückt als 2,5% bis 97,5% Perzentilen, betrug 6,2 bis 29 pg/ml.



XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit
Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.
Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.
Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

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

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

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

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

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

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

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA- TOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	- -	0,3 - 0,1	- 0,3 0,1
Inkubation	1 Std. bei Raumtemperatur durch Schütteln bei 700 rpm		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Tracer	0,1	0,1	0,1
Inkubation	1 Std. bei Raumtemperatur durch Schütteln bei 700 rpm		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DIAsource Katalognummer: KIP1491	Beipackzettelnnummer: 1700531/de	Nummer der Originalausgabe: 090821/1
-------------------------------------	-------------------------------------	---

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

hPTH-120 min-IRMA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1491: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A Attività biologiche

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

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

B. Applicazione clinica

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource hPTH-120 min-IRMA è una verifica immunoradiometrica in due fasi basata sul principio di separazione in provetta rivestita. Essa consente di determinare la presenza di PTH umano intatto (hPTH) nel siero. Gli anticorpi di capra specifici per il frammento hPTH 1-34 (frammento N-terminale) vengono fissati sulla superficie inferiore e interna delle provette in plastica. Alle provette vengono aggiunti calibratori o campioni. Dopo 1 ora di incubazione, con il lavaggio vengono eliminati eventuali eccessi di antigene e i frammenti centro-regionali e C-terminali.

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

V. REATTIVI FORNITI

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

Note:

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

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

- 1. Acqua distillata.
- 2. Pipette per dispensare 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2 ml e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- 3. Agitatore tipo vortex.
- 4. Agitatore magnetico.
- 5. Agitatore per provette (700 g/m)

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

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 3,0 ml di soluzione di ricostituzione e gli altri calibratori con 2,0 ml di soluzione di ricostituzione.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 2,0 ml di soluzione di ricostituzione.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 27 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (28 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- § I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- § Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono molto instabili, quindi utilizzarli immediatamente dopo la ricostituzione. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C per un periodo non superiore a 3 mesi. Evitare cicli consecutivi di congelamento-scongelo.
- § La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- § Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- § Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.
- B. **Metodo del dosaggio**
 - 1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
 - 2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 300 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
 - 3. Dispensare 100 µl di tampone di incubazione in ogni provetta, ad eccezione di quelle per l'attività totale.
 - 4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
 - 5. Incubare 1 ora a temperatura ambiente in un agitatore per provette (700 g/m).
 - 6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
 - 7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
 - 8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.

9. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
10. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Dispensare 100 µl di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
12. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
13. Incubare 1 ora a temperatura ambiente in un agitatore per provette (700g/m).
14. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
15. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
16. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
17. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
18. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
19. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTAT

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

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		237132	100
Calibratore	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 4,1 pg/ml.

B. Specificità

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

Analita aggiunto a un siero a bassa concentrazione di PTH	Livello di PTH osservato (pg/ml)	Analita aggiunto a un siero a alta concentrazione di PTH	Livello di PTH osservato (pg/ml)
Nulla	43	Nulla	444
frammento 1-34 hPTH 2000 pg/ml	42	frammento 1-34 hPTH 2000 pg/ml	443
frammento 44-68 hPTH100000 pg/ml	44	frammento 44-68 hPTH100000 pg/ml	448
frammento 73-84 hPTH100000 pg/ml	45	frammento 73-84 hPTH100000 pg/ml	453
proteina legata al hPTH		proteina legata al hPTH	
frammento 1-34 100000 pg/ml	42	frammento 1-34 100000 pg/ml	436

Questo dimostra che il hPTH-120 min-IRMA non cross-reagisce con i frammenti di hPTH e la proteina legata al hPTH.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
2	1/64	11,1	9,8
	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO			
Campione	PTH aggiunta (pg/ml)	PTH recuperata (pg/ml)	Recopero (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

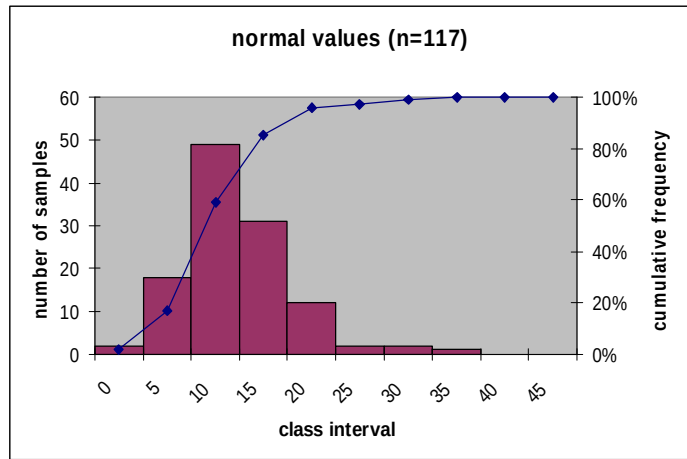
TEMPO TRASCORSO					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione per la differenza tra i risultati doppi dei campioni devono riflettere la Buona prassi di laboratorio

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.
Il range dei livelli di PTH in 117 pazienti normali, espresso in percentili da 2,5% a 97,5% era compreso tra 6,2 e 29 pg/ml.



XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.
L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

2. MARTIN K.J., HRUSKA K.A., FREITAG J.J., KLAH S. and SLOPOPOLSKY E. (1979)
"The peripheral metabolism of parathyroid hormone".
New Engl. J. Med., 301, 20:1092.
J. Clin. Invest., 65:1309.

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

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

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

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

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

Numero di catalogo di DIASource : KIP1491	P.I. numero : 1700531/it	Revisione numero : 090821/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2009-08-21

Leer el protocolo completo antes de usar.

hPTH-120 min-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1491 : 96 Tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades Biológicas

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

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

B. Aplicación clínica

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

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

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

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit
- Agua destilada
 - Pipetas de 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
 - Vortex
 - Agitador magnético
 - Agitador de tubos
 - Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado

- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 3 ml de solución de reconstitución y otros calibradores con 2 ml de solución de reconstitución.
- Controles:** Reconstituir los controles con 2 ml de solución de reconstitución.
- Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 27 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (28x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los calibradores y los controles son muy inestables, utilizar inmediatamente después de la reconstitución, congelar inmediatamente en alícuotas y guardar a -20°C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2 – 8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 8hrs., almacenar las muestras a -20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Plasma (heparina y EDTA) proporciona resultados más elevados que el Suero.
Y(suero) = 1,01 x (plasma EDTA) – 21,54 r=0,91 n=6
Y(suero) = 0,99 x (plasma heparina) – 6,14 r=0,94 n=10

X. PROTOCOLO

- Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.
- Protocolo**
 - Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 - Agitar brevemente los calibradores, controles y muestras y dispensar 300 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispensar 100 µL del Tampón de Incubación en cada tubo, excepto los de Cuentas Totales.
 - Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
 - Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (700 rpm).
 - Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 - Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
 - Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
 - Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). .
 - Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
 - Dispensar 100 µL del anti-PTH-¹²⁵I trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.

12. Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
13. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (700 rpm).
14. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
15. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
16. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
17. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). .
18. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
19. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o linear el c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de PTH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de proceso de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		237132	100
Calibrador	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.
El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 4,1 pg/ml .

B. Especificidad

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

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

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

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
	1/64	11,1	9,8
2	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN			
Muestra	PTH añadido (pg/ml)	PTH Recuperado (pg/ml)	Recuperado (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

- E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra
- Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

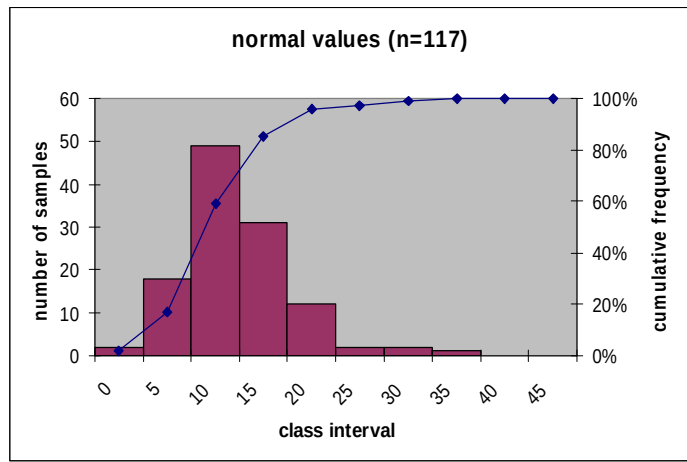
TIEMPO DE ESPERA					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.
El alcance de los niveles de PTH levels en 117 pacientes normales, expresado como percentilos de 2,5% a 97,5% fue 6,2 a 29 pg/ml.



XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

DIAsource Catalogo Nr: KIP1491	P.I. Numero: 1700531/es	Revisión nr: 090821/1
-----------------------------------	----------------------------	--------------------------

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

hPTH-120 min-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ hPTH-120 min-IRMA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP1491: 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

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

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

B. Κλινική εφαρμογή

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

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

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:
1. Απεσταγμένο νερό

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

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

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

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

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

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- B. Διαδικασία**
1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
 2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτική στροβίλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 300 μl από έκαστο στα αντίστοιχα σωληνάρια.
 3. Διανείμετε 100 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
 4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
 5. Επώαστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 700 rpm.

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

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")		237132	100
Βαθμονομητής	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης**
Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 4.1 pg/ml.
- B. Ειδικότητα**
Πεπτίδια που πιθανώς επιδρούν προστέθηκαν σε ένα ορό με υψηλό επίπεδο PTH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της PTH.

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

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

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προσθεθείσα PTH (pg/ml)	Ανακτηθείσα PTH (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
	1/64	11,1	9,8
2	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

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

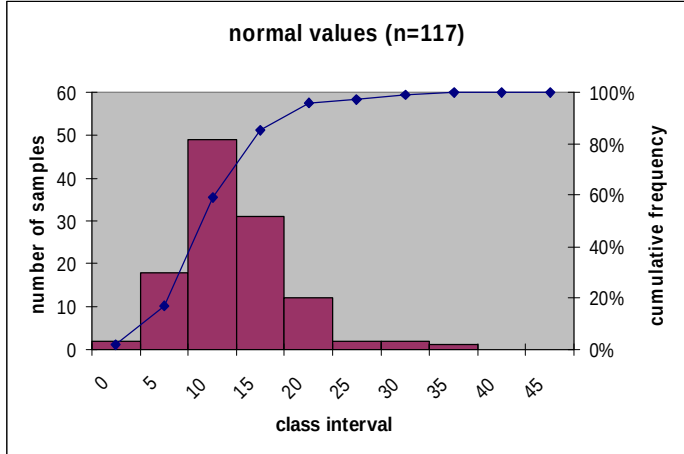
ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές παρέχονται πιο κάτω μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.
Το πεδίο τιμών των επιπέδων της PTH σε 117 φυσιολογικούς ασθενείς, εκφρασμένο ως ποσοστό επί τοις εκατό 2,5% έως 97,5%, ήταν 6,2 έως 29 pg/ml.



XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας
Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.
Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφαλείας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφαλείας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.
Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφαλείας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

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

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

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

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

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

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP1491	Αριθμός P.I.: 1700531/el	Ημερομηνία έκδοσης: 090821/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2009-08-21



pl

Przed użyciem zapoznaj się z treścią instrukcji.

hPTH-120 min-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

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

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa zestawu: DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP1491: 96 oznaczeń
- C. Producent: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

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

Tel: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Parathormon ludzki (hPTH) jest głównym fizjologicznym regulatorem metabolizmu fosfowapniowego. hPTH zwiększa zawartość wapnia w surowicy poprzez oddziaływanie na wątrobę (poprawia reabsorpcję tubularnego Ca^{++} i wydzielanie fosforanów) i kości (stymulując czynności osteoklastyczne i resorpcję kostną). Pośrednio wpływa na wchłanianie Ca^{++} przez jelita poprzez stymulację w nerkach reakcji hydroksylacji w pozycji 1- α hydroksy-witaminy D. Wydzielanie PTH jest kontrolowane stężeniem Ca^{++} z surowicy krwi, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. PTH jest produkowany głównie w komórkach przytarczyc i wydzielany jako 84 aminokwasowa cząsteczka. Parathormon w surowicy krwi występuje jako hormon niezmieniony tzw. „intact (PTH 1-84)”. Jest to główny produkt wykazujący aktywność biologiczną. Cząsteczka ta podlega degradacji (w pozycji między 33-37 aminokwasem). Powstają dwa fragmenty: fragment N-końcowy, aktywny biologicznie, fragment C-końcowy, nieaktywny biologicznie. Fragmenty C-końcowe są usuwane tylko w procesie filtracji w kłębuszkowej, podczas gdy aktywne biologicznie formy: „intact-PTH” i fragment N-końcowy są również metabolizowane w wątrobie oraz w innych tkankach. Biologiczny czas połowicznego rozpadu fragmentów końcowych bardzo znacznie wzrasta u pacjentów z niewydolnością nerek. Oznaczanie „intact-PTH” pozwala ocenić zarówno jego wydzielanie jak i aktywność biologiczną.

B. Zastosowanie kliniczne

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

IV. ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Zestaw DIAsource hPTH-120 min-IRMA jest dwustopniowym testem immunoradiometrycznym opartym na separacji próbek opłaszczonych przeciwciałami. Pozwala określić poziom ludzkiego intact PTH (hPTH) w surowicy. Kozie przeciwciała swoiste wobec fragmentu 1-34 hPTH (fragment N-końcowy) przytwierdzone są do dolnej wewnętrznej powierzchni plastikowych próbek. Do próbek dodane zostają kalibratory lub próbki. Po 1 godzinie inkubacji, przepłukanie usuwa sporadyczny nadmiar antygenu, fragmentów środkowych oraz C-końcowych. Dodane zostają przeciwciała monoklonalne znakowane ¹²⁵I swoiste wobec fragmentu 44-68 hPTH. Po 1 godzinie inkubacji i przepłukaniu promieniotwórczość, która pozostała w próbce odzwierciedla stężenie intact h-PTH. Ten dwustopniowy test IRMA jest wysoce swoisty na intact h-PTH i nie wchodzi w reakcję krzyżową z aktywnymi i nieaktywnymi fragmentami nawet przy dużych stężeniach, tak jak sugeruje HACKENG i in.

V. SKŁAD ZESTAWU

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

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

VI. DODATKOWE MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE

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

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

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

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

VIII. PRZECHOWYWANIE ORAZ OKRES WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW I PRÓBEK

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

IX. PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

- § Surowica i osocze powinny być przechowywane w temp. 2-8°C.
- § Jeżeli test nie będzie wykonywany w ciągu 8 godzin, zaleca się zamrożenie próbek w temp. -20°C.
- § Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania próbek.
- § Użycie osocza (heparyna lub EDTA) zapewni uzyskanie wyższych wyników niż w przypadku surowicy.
Y (surowica) = 1,01x (osocze EDTA) – 21,54 r = 0,91 n = 6
Y (surowica) = 0,99x (osocze heparynizowane) – 6,14 r = 0,94 n = 10

X. PROCEDURA

- A. Przestrzeganie następujących zasad zagwarantuje powtarzalność oznaczeń. Nie należy wykonywać testu po upływie daty ważności odczynników. Nie należy łączyć odczynników z różnych zestawów, posiadających inny numer serii. Przed wykonaniem testu składniki zestawu należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Dokładnie wymieszać wszystkie odczynniki oraz próbki poprzez delikatne wytrząsanie. Zapobiegać zanieczyszczeniom odczynników i wody przez drobnoustroje. Stosować wymienne, jednorazowe końcówki do pipet osobne dla każdego odczynnika i dla każdej próbki. Używać wody destylowanej i czystych pojemników. Używać wykalibrowanych pipet w celu zapewnienia precyzji oznaczeń. Do każdego cyklu oznaczeń należy wykonać nową krzywą standardową.
- B. **Procedura**
 - Oznaczyć w dubletach próbówki opłaszczone dla każdego kalibratora, próby badanej i kontroli. Do oznaczania zliczeń całkowitych oznaczyć dwie zwykle próbówki.
 - Wymieszać kalibratory, kontrole i próbki badane na wytrząsarce typu vortex, po czym dodawać po 300 µl każdego z nich do odpowiednich próbek.
 - Dodawać po 100 µl buforu do inkubacji do każdej próbówki, łącznie z próbkami dla zliczeń całkowitych.
 - Wstrząsnąć delikatnie statywem, aby uwolnić bąbelki powietrza.
 - Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce do próbek (700 rpm).
 - Odciągnąć płyn z każdej próbówki (lub zdekantować) z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych. Należy upewnić się, że plastikowa końcówka odciągacza znajduje się na dnie próbówki, w celu odciążenia całego płynu.
 - Przepłukać próbówki za pomocą 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych). Unikać spieniania przy pipetowaniu.
 - Odciągnąć (lub zdekantować) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych).
 - Ponownie przemyć próbówki za pomocą 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych), po czym odciągnąć (lub zdekantować).
 - Po ostatnim przepłukaniu pozostawić próbówki w pozycji pionowej na dwie minuty, po czym zassać pozostałe krople płynu

11. Do każdej próbki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 100 µl PTH oznakowanego jodem¹²⁵.
12. Wstrząsnąć delikatnie statywem, aby uwolnić bąbelki powietrza.
13. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce do próbek (700 rpm).
14. Odciągnąć płyn z każdej próbki (lub zdekantować) z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych. Należy upewnić się, że plastikowa końcówka odciągacza znajduje się na dnie próbki, w celu odciągnięcia całego płynu.
15. Przepłukać próbki za pomocą 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych). Unikać spieniania przy pipetowaniu.
16. Odciągnąć (lub zdekantować) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych).
17. Ponownie przemyć próbki za pomocą 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych), po czym odciągnąć (lub zdekantować).
18. Po ostatnim przepłukaniu pozostawić próbki w pozycji pionowej na dwie minuty, po czym zassać pozostałe krople płynu.
19. Zliczyć aktywność związaną z próbkami na liczniku promieniowania gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Policzyc wartości średnie z dubletów.
2. Na papierze o skali półlogarytmicznej lub liniowej wykreślić krzywą dla każdego kalibratora: aktywność c.p.m. (oś rzędnych) względem odpowiednich stężeń PTH (oś odciętych), po czym poprowadzić krzywą wzorcową przez punkty kalibracji, odrzucić wyniki krańcowe.
3. Odczytać stężenie każdej kontroli i próbki poprzez interpolację na krzywej wzorcowej.
4. Powyższe obliczenia można uprościć, stosując komputerową redukcję danych. W przypadku użycia automatycznego obliczania wyników, zaleca się wykorzystanie 4-parameterowej funkcji krzywej logistycznej.

XII. PRZYKŁAD TYPOWEJ KRZYWEJ WZORCOWEJ

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

hPTH-120 min-IRMA		cpm	B/T (%)
Ilość zliczeń TOTAL		237132	100
Kalibratory	0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. CHARAKTERYSTYKA OZNACZENIA I OGRANICZENIA

A. Czulość zestawu

Czulość zestawu zdefiniowana jako wartość stężenia PTH odpowiadająca wartości dwóch odchyłeń standardowych dla kalibratora zero (określonych na podstawie 20 różnych oznaczeń) wynosi 4.1 pg/ml.

B. Specyficzność

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

Analit dodany do surowicy o niskim poziomie PTH	Obserwowany poziom PTH (pg/ml)	Analit dodany do surowicy o wysokim poziomie PTH	Obserwowany poziom PTH (pg/ml)
Brak	43	Brak	444
Fragment 1-34 hPTH 2000 pg/ml	42	Fragment 1-34 hPTH 2000 pg/ml	443
Fragment 44-68 hPTH 100000 pg/ml	44	Fragment 44-68 hPTH 100000 pg/ml	448
Fragment 73-84 hPTH 100000 pg/ml	45	Fragment 73-84 hPTH 100000 pg/ml	453
Białko powiązane z hPTH		Białko powiązane z hPTH	
Fragment 1-34 100000 pg/ml	42	Fragment 1-34 100000 pg/ml	436
Brak	11	Brak	880
Fragment 53-84 hPTH 100000 pg/ml	18,4	Fragment 53-84 hPTH 100000 pg/ml	841

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

C. Precyzja

zmienność międzyseryjna				zmienność międzyseryjna			
Surowica	Replikat	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)	Surowica	Replikat	<X> ± S.D. (pg/ml)	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD: odchylenie standardowe; CV: współczynnik zmienności

D. Dokładność

ODZYSK			
Próbka	Dodane PTH (pg/ml)	Odzyskane PTH (pg/ml)	Odzysk (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

TEST ROZCIEŃCZANIA			
Próbka	Proporcja	Stężenie teoretyczne (pg/ml)	Stężenie zmierzone (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
2	1/64	11,1	9,8
	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

Próbki rozcieńczono za pomocą kalibratora zerowego.

E. Przesunięcie czasowe w trakcie dozowania

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

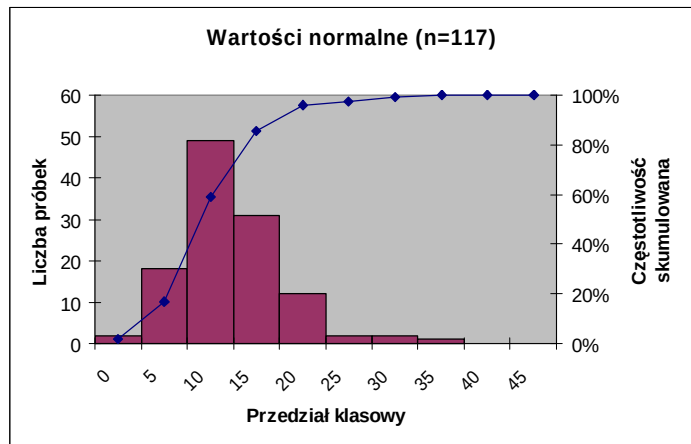
CZAS PRZESUNIĘCIA					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

XV. ZAKRES NORMY

Każde laboratorium powinno ustalić własne zakresy normy. Normy podane poniżej należy traktować jako wskazówkę
Zakres poziomów PTH u 117 zdrowych pacjentów wyrażony jako 2,5% do 97,5% percyntyli wynosił 6.2 do 29 pg/ml.



XVI. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Bezpieczeństwo

Zestaw jest przeznaczony jedynie do diagnostyki in vitro.
Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV).
Przestrzeganie podstawowych zasad ochrony radiologicznej gwarantuje bezpieczeństwo.
Produkty radioaktywne mogą być nabywane, otrzymywane, przechowywane i używane jedynie przez osoby do tego upoważnione oraz w laboratoriach posiadających odpowiednią autoryzację. Roztwory w żadnym przypadku nie mogą być podawane ludziom ani zwierzętom.
Zasady stosowania produktów radioaktywnych regulują przepisy danego kraju. Materiały promieniotwórcze można wykorzystywać w obszarach specjalnie do tego przeznaczonych. Laboratorium powinno prowadzić dziennik przechowywanych materiałów promieniotwórczych. Aparatura laboratoryjna oraz wyroby szklane, które mogą ulec skażeniu przez materiały promieniotwórcze, powinny zostać oddzielone, w celu uniknięcia ich skażenia. Każdy wyciek radioaktywny należy natychmiast zmyć zgodnie z lokalną procedurą bezpieczeństwa promieniotwórczego. Odpady radioaktywne należy usuwać zgodnie z przepisami prawnymi obowiązującymi w danym państwie. Postępowanie wg podstawowych zasad bezpieczeństwa radioaktywnego zapewnia wystarczającą ochronę.
Odczynniki zestawu zawierające składniki pochodzenia ludzkiego zostały przetestowane licencjonowanymi zestawami (sprawdzone metodami Europejskimi zatwierdzone przez FDA) i wykluczono obecność przeciwciał anty-HIV 1, anty-HIV 2, anty- HCV i antygeny HBs. Mimo to nie ma jednak pełnej gwarancji, że takie składniki nie mogą przenosić żółtaczki, wirusów HIV czy innych infekcji wirusowych – dlatego też zarówno te odczynniki, jak i próbki pacjentów należy traktować jako potencjalne źródło zakażenia.
Składniki pochodzenia zwierzęcego w odczynnikach zestawu, zostały pobrane od zwierząt zdrowych. Składniki pochodzenia wołowego pochodzą z państw, gdzie nie stwierdzono przypadków zarażenia BSE. Mimo to, wszyskie próbki pochodzenia zwierzęcego należy traktować jako potencjalnie zakaźne.
Unikać kontaktu ze skórą jakiegokolwiek z odczynników (azydek sodu jako konserwant). Azydek sodu może reagować z ołowianymi lub miedzianymi rurami, w wyniku czego mogą odkładać się na nich wybuchowe azydki metali. Aby temu zapobiec należy po wylaniu odpadów dobrze przepłukać rury kanalizacyjne.
Nie palić, nie jeść, nie pić ani nie używać kosmetyków w obszarze pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać odzież ochronną i gumowe rękawiczki.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

XVIII. SCHEMAT PROCEDURE

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

DIAsource Katalog Nr: KIP1491	Numer P.I.: 1700531/pl	Data wydania: 090821/1
----------------------------------	---------------------------	---------------------------



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

hPTH-120 min-IRMA

I. УПОТРЕБА

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

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource hPTH-120 min-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP1491: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue De l'Industrie 8 B-1400 Nivelles, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)67 88.99.99 Факс: +32 (0)67 88.99.96

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

Човешкият паратиреоиден хормон (hPTH) е основен физиологичен регулатор на калциевия и фосфорен метаболизъм. hPTH увеличава серумните концентрации на калция чрез въздействие върху бъбреците (увеличавайки тубуларната реабсорбция на Ca^{++} и екскрецията на фосфати) и костите (стимулирайки остеокластичната активност и костната резорбция). Той влияе непосредствено върху чревната абсорбция на Ca^{++} чрез стимулиране на бъбречната 1α -хидроксилация на 25-хидроксивитамин D. Освобождането на PTH се контролира в отрицателна обратна връзка чрез серумните концентрации на Ca^{++} . PTH се синтезира в главните клетки на паратиреоидните жлези и се секретира като 84 аминокиселинна молекула, наречена "незасегнат PTH", който е основният биологично активен продукт. Тази молекула се разлага чрез протеолитичното разцепване на аминокиселините 33-37 в периферните тъкани до образуването на биологично активни фрагменти с крайна аминова група и биологично неактивни фрагменти с крайна карбоксилова група. Фрагментите с крайна карбоксилова група се отстраняват само чрез гломерулна филтрация, докато биоактивният незасегнат PTH и фрагментите с крайна аминова група се разлагат метаболитно в черния дроб и други тъкани. Полуживотът на фрагментите с крайна карбоксилова група се увеличава значително при пациенти с бъбречна недостатъчност. И така, измерването на незасегнатия PTH отразява най-точно хормоналното производство и биологичната активност.

B. Клинично приложение

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

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource hPTH-120 min-IRMA представлява двуфазно имунорадио-метрично изследване, базирано на сепарация на покрити епруветки. То позволява определяне съдържанието на незасегнат човешки PTH (hPTH) в серума. Кози антитела специфични за фрагмента 1-34 hPTH (фрагмент с краен N) се имобилизират към долната и вътрешната повърхност на пластмасовите епруветки. Към епруветките се добавят калибратори или проби. След едночасова инкубация случайният излишък на антигени, средно регионални фрагменти и фрагменти с краен C се отстранява чрез измиване.

Добавят се натоварени с ¹²⁵I моноклонални антитела, специфични за фрагмента 44-68 hPTH. След едночасова инкубация и измиване остатъчната радиоактивност, свързана към епруветката, отразява концентрацията на незасегнатия h-PTH. Това двуфазно изследване на IRMA е силно специфично за незасегнатия h-PTH и не проявява кръстосана реактивност с активните и неактивните фрагменти дори и във високи концентрации, както предполага и HACKENG et al.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

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

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

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

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

- 1. Дестилирана вода
- 2. Пипети от: 100 µl, 300 µl, 1 ml, 2 ml и 3 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с крайници за еднократна употреба).
- 3. Завихрящ смесител
- 4. Магнитен сепаратор
- 5. Клатещо устройство за епруветки (700 rpm)

- 6. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- 7. Аспирационна система (по избор).
- 8. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

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

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

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

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

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

Y (серум) = 0,99x (хепаринизирана плазма) – 6,14 r = 0,94 n = 10
Y (серум) = 1,01x (плазма с EDTA) – 21,54 r = 0,91 n = 6

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

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

B. Процедура

- 1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- 2. Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 300 µl от всяко в съответните епруветки.
- 3. Разпределете 100 µl инкубационен буфер във всяка епруветка, с изключение на тези за определяне на общия брой импулси.
- 4. Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
- 5. Инкубирайте за 1 час при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (700 оборота в минута).
- 6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че

- пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивачия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измивач разтвор.
 - Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
 - Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивачия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
 - След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
 - Разпределете 100 µl от анти-РТН-¹²⁵I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
 - Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
 - Инкубирайте за 1 час при стайна температура в клетъчно устройство за епруветки (700 оборота в минута).
 - Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
 - Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивачия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измивач разтвор.
 - Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
 - Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивачия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
 - След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
 - Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
- На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на РТН и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
- Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
- Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

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

hPTH-120 min-IRMA		срм	В/Т (%)
Общ брой		237132	100
Калибратор	0,0 pg/ml	723	0,3
	7,4 pg/ml	1011	0,4
	12,9 pg/ml	1554	0,7
	36,5 pg/ml	3949	1,7
	116 pg/ml	9697	4,1
	396 pg/ml	31685	13,4
	973 pg/ml	54558	23,0

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 4,1 pg/ml.

B. Специфичност

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

Добавено анализно вещество към серума с ниско ниво на РТН	Наблюдавано ниво на РТН (pg/ml)	Добавено анализно вещество към серума с високо ниво на РТН	Наблюдавано ниво на РТН (pg/ml)
Нищо	43	Нищо	444
hPTH 1-34 фрагмент 2000 pg/ml	42	hPTH 1-34 фрагмент 2000 pg/ml	443
hPTH 44-68 фрагмент 100000 pg/ml	44	hPTH 44-68 фрагмент 100000 pg/ml	448
hPTH 73-84 фрагмент 100000 pg/ml	45	hPTH 73-84 фрагмент 100000 pg/ml	453
hPTH-свързан протеин 1-34 фрагмент 100000 pg/ml	42	hPTH-свързан протеин 1-34 фрагмент 100000 pg/ml	436
Нищо	11	Нищо	880
hPTH 53-84 фрагмент 100000 pg/ml	18,4	hPTH 53-84 фрагмент 100000 pg/ml	841

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

C. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	N	<X>±S.D. pg/ml	CV (%)	Серум	N	<X>±S.D. pg/ml	CV (%)
A	10	50,7 ± 2,1	4,2	C	20	95,9 ± 6,3	6,6
B	10	233 ± 7	2,8	D	20	342 ± 11	3,2

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ			
Проба	Добавен РТН (pg/ml)	Възстановен РТН (pg/ml)	Възстановяване (%)
1	49	47	97
	118	111	94
	218	212	97
2	178	163	92
	247	228	92
	347	318	92

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ			
Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (pg/ml)	Измерена концентрация (pg/ml)
1	1/1	-	711,9
	1/2	356,0	363,5
	1/4	178,0	185,0
	1/8	89,0	86,7
	1/16	44,5	39,9
	1/32	22,2	20,2
	1/64	11,1	9,8
2	1/1	-	532,7
	1/2	266,4	270,9
	1/4	133,2	137,4
	1/8	66,6	72,6
	1/16	33,3	32,6
	1/32	16,6	18,4
	1/64	8,3	9,4

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

E. Закъснение

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

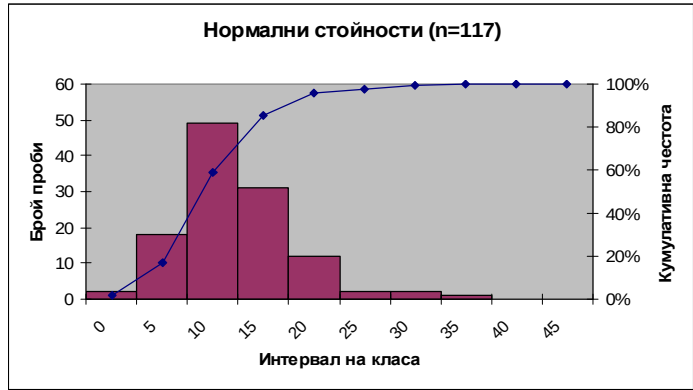
Закъснение					
	0'	10'	15'	20'	30'
C1	105,5	109	95,5	109,5	108,4
C2	264,7	266,6	273,2	257,9	258,7

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

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

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности. Интервалът на нивата на РТН при 117 нормални пациенти, изразен в проценти: от 2,5% до 97,5%, бе 6,2 до 29 pg/ml.



XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност
Само за *in vitro* диагностика.
Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.
Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.
Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и съгласията, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионуклиди.
Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.
Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.
Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

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

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

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

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

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

DIAsource каталог номер: KIP1491	P.I. номер: 1700531/bu	Номер на ревизия: 090821/1
-------------------------------------	---------------------------	-------------------------------

Дата на ревизия: 2009-08-21

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuugaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuugaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substraat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuugaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuugaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuugaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylen glykol
	Solução de Extracção	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σοληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikropłytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>		
	Вижте инструкцията за работа		
	Температура на съхранение		
	Използвайте с		
	Партиден код		
	Каталожен номер		
	Контрол		
	Ин витро диагностично медицинско изделие		
	Производител		
	Съдържание достатъчно за <n> теста		
	Концентриран измиващ разтвор		
	Нулев калибратор		
	Калибратор #		
	Контрол #		
	Трейсър		
	Трейсър		
	Концентриран маркер		
	Концентриран маркер		
	Епруветки		
	Инкубационен буфер		
	Ацетонитрил		
	Серум		
	Разредител за пробите		
	Буфер за разреждане		
	Антисерум		
	Имуноабсорбент		
	Разредител за калибратора		
	Пресъздаващ разтвор		
	Полиетилен гликол		
	Екстрактов разтвор		
	Разтвор за елюиране		
	Силикагелни пълнители		
	Пред-лечебен разтвор		
	Неутрализиращ разтвор		
	Маркерен буфер		
	Микротитърна пластина		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгиран концентрат		
	HRP конюгиран концентрат		
	Буфер за конюгата		
	Хромогенен TMB концентрат		
	Хромогенен TMB разтвор		
	Субстратен буфер		
	Стоп разтвор		
	Инкубационен серум		
	Буфер		
	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза		
	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат		
	Биотин конюгиран концентрат		
	Авидин HRP концентрат		
	Буфер за пробите		
	Биотин конюгат		
	специфично антитяло		
	стрептавидин HRP концентрат		
	не специфично свързване		
	второ антитяло		
	киселинизиращ буфер		