

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

PTH intact ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of intact Parathyroid Hormone (PTH) in human serum



REF DE3645

 96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
 Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

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

1	NAME AND INTENDED USE	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION.....	3
3	CLINICAL SIGNIFICANCE	3
4	PRINCIPLE OF THE TEST	3
5	KIT COMPONENTS.....	4
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS	4
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	4
8	REAGENT PREPARATION AND STORAGE	5
9	ASSAY PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS	6
11	QUALITY CONTROL.....	7
12	LIMITATIONS OF PROCEDURE	7
13	EXPECTED VALUES	7
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	10
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG	10
3	KLINISCHE BEDEUTUNG	10
4	TESTPRINZIP	11
5	TESTKIT-KOMPONENTEN.....	11
6	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	12
7	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG	12
8	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG.....	12
9	TESTVERFAHREN.....	13
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
11	QUALITÄTSKONTROLLE	16
12	GRENZEN DES VERFAHRENS	16
13	ERWARTETE WERTE	16
14	LEISTUNGSMERKMALE	16
15	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1 NAME AND INTENDED USE

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

2 SUMMARY AND EXPLANATION

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

3 CLINICAL SIGNIFICANCE

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

4 PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

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

5 KIT COMPONENTS

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

5.1 MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing may be acceptable].
- Precision Pipettors to deliver 25, 100 and 150 µL.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 50, 100 and 150 µL.

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

Although the reagents provided in this kit has been specifically designed to contain no human blood components, the human patient samples, which might be positive for HBsAg, HBcAg or HIV antibodies, must be treated as potentially infectious biohazard. Common precautions in handling should be exercised, as applied to any untested patient sample. Stopping Solution consists of 1 N acidic solution. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection, with appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

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

8 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

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

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

9 ASSAY PROCEDURE

1. Place sufficient **Streptavidin Coated Strips** in a holder to run all six (6) PTH calibrators, A - F of the Intact PTH CALIBRATORS [Exact concentration is stated on the QC data sheet], Quality Control Sera and patient samples.
At a minimum, designate two wells to serve as "blanks". Refer to Step 9 for final plate reading.
2. Pipet **25 µL** of calibrators, controls, and samples into the designated or mapped well.
Freeze (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.
3. Add or dispense **50 µL** of Reagent 1 (Biotinylated Antibody) into each of the wells which already contain the calibrators, controls, and samples.
4. Add or dispense **50 µL** of Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) into each of the same wells. Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on an **orbital shaker or rotator** set at 170 ± 10 rpm for **3 hours** \pm 30 minutes at room temperature (22 °C – 28 °C).
5. First aspirate the fluid completely and then wash/aspirate each well five (5) times with the Working Wash Solution (prepared from Reagent A), using an automatic microplate washer. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
6. Add or dispense **150 µL** of the Reagent B (TMB Substrate) into each of the wells.
7. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on an **orbital shaker or rotator** set at 170 ± 10 rpm for **30 \pm 5 minutes** at room temperature (22 °C – 28 °C).
8. Add or dispense **100 µL** of the Stopping Solution into each of the wells. Mix gently.
9. Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. **Read** the plate **again** with the reader set to **405 nm** against distilled or deionized water.
Note: The second reading is designed to extend the analytical validity of the calibration curve to the value represented by the highest calibrator, which is approximately 700 – 1,000 pg/mL. Hence, patient samples with PTH > 200 pg/mL can be quantified against a calibration curve consisting of the readings all the way up to the concentration equivalent to the highest calibrator using the 405 nm reading, away from the wavelength of maximum absorbance. In general, patient and control samples should be read using the 450 nm for PTH concentrations up to 200 pg/mL. PTH concentrations above 200 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.
10. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct a calibration curve via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of the intact PTH.

9.1 Procedural Notes

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

10 CALCULATION OF RESULTS

10.1 Manual Method

1. For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using the three calibrators with the highest concentrations, i.e. Calibrators D, E and F.
2. Assign the concentration for each calibrator stated on the vial in pg/mL. Plot the data from the calibration curve on linear graph paper with the concentration on the X-axis and the corresponding A.U. on the Y-axis.
3. Draw a straight line between 2 adjacent points. This mathematical algorithm is commonly known as the "point-to-point" calculation. Obtain the concentration of the sample by locating the absorbance unit on the Y-axis and finding the corresponding concentration value on the X-axis. Patient and control samples should be read using the 450 nm for PTH concentrations up to 200 pg/mL. PTH concentrations above 200 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.

10.2 Automated Method

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11 QUALITY CONTROL

Control serum or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

12 LIMITATIONS OF PROCEDURE

The DEMEDITEC PTH ELISA kit has exhibited no “high dose hook effect” with samples spiked with 2,100,000 pg/mL of Intact PTH. Samples with intact PTH levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and reassayed for correct values. Like any analyte used as a diagnostic adjunct, intact PTH results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests.

13 EXPECTED VALUES

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

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Accuracy

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

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

14.2 Sensitivity

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

14.3 Specificity and Cross-Reactivity

The antibodies used in the DEMEDITEC PTH ELISA were purified by affinity chromatography to be specific for well-defined regions on the PTH molecule. The peroxidase labeled antibody recognizes only the N-terminal region or the 1-34 amino acid sequence of the PTH molecule; whereas the biotinylated antibody is specific to the 39-84 segment. Accordingly, only intact PTH, which requires binding by both the enzyme conjugated and biotinylated antibodies, can be detected by this assay. To further achieve the specificity of this assay, conjugation and biotinylation and the molar ratios thereof, have been optimized to minimize detection of fragments of PTH. Human PTH 1-34 at levels up to 300 pg/mL and the C-terminal 39-84 fragment at levels up to 300,000 pg/mL give molar cross reactivities to PTH of less than 2% and 0.02%, respectively.

14.4 Precision and Reproducibility

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

Intra-Assay Variation

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

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

Inter-Assay Variation

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

14.5 Recovery

Various amounts of PTH 1-84 were added to three different patient sera to determine the recovery. The results are described in the following table:

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

Average 103%

14.6 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism

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

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

Average 95%

1 VERWENDUNGSZWECK

Der Intakt-PTH ELISA dient der quantitativen Bestimmung von iPTH (intaktem Parathormon) in Humanserum. Dieser Assay ist für die in vitro-Diagnostik vorgesehen.

2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

PTH (Parathormon, Parathyrin, Parathyroidhormon) wird in den Nebenschilddrüsen als Präproparathormon, eine größere molekulare Hormonvorstufe, die aus 115 Aminosäuren besteht, biosynthetisiert. Das Präproparathormon wird nach einer sequenziellen intrazellulären Spaltung einer Sequenz von 25 Aminosäuren in die Hormonvorstufe Proparathormon, ein Polypeptid aus 90 Aminosäuren, umgewandelt. Durch weitere proteolytische Modifikationen wird das Proparathormon in Parathormon, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, umgewandelt. Bei gesunden Personen erfolgt die Regulierung der Parathormonsekretion durch eine negative Rückkopplungswirkung des Serumcalciums auf die Nebenschilddrüsen. Intaktes PTH ist biologisch aktiv und wird mit einer Halbwertszeit von weniger als vier Minuten [1] rasch aus dem Kreislauf eliminiert. PTH wird in den Nebenschilddrüsen, jedoch hauptsächlich peripher - insbesondere in der Leber, aber auch in den Nieren und Knochen - proteolytisch gespalten, wobei N-terminale sowie längerlebige C-terminale und mittregionale Fragmente entstehen. Personen mit Niereninsuffizienz weisen in PTH-Tests zur Feststellung von C-terminalen und mittregionalen Fragmenten typischerweise erhöhte Werte auf, wie sie auch mit einer verminderten renalen Clearance einhergehen[2].

3 KLINISCHE BEDEUTUNG

iPTH-Assays sind für die Abgrenzung des primären Hyperparathyreoidismus von anderen (nicht durch die Nebenschilddrüsen bedingten) Ursachen der Hyperkalzämie wie bösartige Gewebeveränderungen, Sarkoidose und Hyperthyreose von großer Bedeutung. Die Messung des Parathormons ist das spezifischste Verfahren zur Diagnose eines primären Hyperparathyreoidismus. Liegt eine Hyperkalzämie vor, kann bei einem gleichzeitig angehobenen Parathormonspiegel die Diagnose praktisch gestellt werden. Bei über 90% der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus ist die Konzentration des Parathormons erhöht[3]. Die häufigste sonstige Ursache einer Hyperkalzämie, eine maligne Grunderkrankung, geht mit supprimierten Konzentrationen des Parathormons[3] bzw. PTH-Konzentrationen innerhalb des Normbereichs einher[4]. Werden die Konzentrationen von iPTH und Serumcalcium zeichnerisch dargestellt, ist der bei Patienten mit einer durch Malignome bedingten Hyperkalzämie festgestellte iPTH-Spiegel fast immer unverhältnismäßig niedrig, wenn diese Werte im Zusammenhang mit den erhöhten Serumcalciumspiegeln interpretiert werden[3,4,5]. Im Gegensatz zu C-terminalen und mittregionalen Fragmenten, deren Werte bei Personen mit Niereninsuffizienz typischerweise extrem erhöht sind, zeigen iPTH-Assays eine weniger starke Beeinflussung durch die abnehmende Nierenfunktion[5]. PTH-Werte sind bei einer Hypokalzämie durch totalen Hypoparathyreoidismus typischerweise nicht nachweisbar. Sie liegen jedoch innerhalb des Normbereichs bei einer durch partiellen Verlust oder Hemmung der Nebenschilddrüsen-Funktion bedingten Hypokalzämie.

4 TESTPRINZIP

Der Intakt-PTH Immunoassay ist ein an zwei Stellen ansetzender ELISA [Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay] zur Messung des 84 Aminosäuren langen biologisch intakten Parathormons (PTH 1-84). 2 verschiedene polyklonale Ziege-Antikörper gegen humanes PTH wurden affinitätschromatographisch gereinigt und sind für hinreichend definierte Regionen des PTH-Moleküls spezifisch. Ein Antikörper ist regionsspezifisch gegen die mittregionale und C-terminale Aminosäuresequenz 39-84. Dieser Antikörper ist biotinyliert. Der andere Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen die N-terminale Aminosäuresequenz 1-34. Dieser Antikörper ist als Detektionsantikörper mit Meerrettich-Peroxidase [HRP] markiert.

Streptavidin beschichtetes Well - Biotinyliertes Anti-PTH (39-84) - Intakt PTH - HRP gekoppeltes Anti-PTH (1-34)

Obwohl mittregionale und C-terminale Fragmente durch das biotinylierte anti-PTH 39-84 gebunden werden, bildet nur iPTH 1-84 den zum Nachweis erforderlichen Sandwich-Komplex. Die Kapazitäten der biotinylierten Antikörper und der mit Streptavidin beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden so angepasst, dass inaktive Fragmente das Ergebnis selbst bei höheren Konzentrationen nur in irrelevantem Maße beeinflussen. In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten. Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration an intaktem PTH in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die Konzentrationen an intaktem PTH in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt.

5 TESTKIT-KOMPONENTEN

Testkit-Komponenten	Bezeichnung	Menge
Biotin Ab = Reagent 1	Biotinylierter PTH-Antikörper	1 x 7.0 mL
ENZ Ab = Reagenz 2	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter PTH-Antikörper	1 x 7.0 mL
SUB TMB = Reagenz B	TMB-Substrat [Tetramethylbenzidin]	1 x 20 mL
DIL = Reagenz 3	Verdünnungspuffer [Pferdeserum] für Patientenproben mit Werten außerhalb des Messbereichs	1 x 2 mL
BUF WASH 20x = Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergens]	1 x 30 mL
STOP SOLN = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N saure Lösung]	1 x 20 mL
RECO SOLN = Reagenz 4	Rekonstitutionslösung mit Detergens	1 x 5 mL
SORB MT = Mikrotiterplatten	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen á 8 Vertiefungen
CAL = Kalibratoren A: 0 pg/mL B – F: Genaue Konzentrationen auf QC Datenblatt	Lyophilisiertes synthetisches h-PTH. Lyophilisierter Nullkalibrator [BSA/Ziegenserum-Lösung]. Alle anderen Kalibratoren enthalten synthetisches h-PTH 1-84 in BSA/Ziegenserum-Lösung].	1 x 0.5 mL je Level
CONTROL = Kontrollen 1 & 2 Genaue Konzentrationen auf QC Datenblatt	Lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h-PTH 1-84 in BSA/Ziegenserum-Lösung].	1 x 0.5 mL je Level

5.1 Weitere erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltenen Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Lesegerät
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 25, 100 und 150 µL
- (Optional): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 50, 100 und 150 µL

6 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieses Testkits sind spezifisch so beschaffen, dass sie keine humanen Blutkomponenten enthalten. In den humanen Patientenproben kann das Vorhandensein von HBsAg, HBeAg bzw. HIV-Antikörpern jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Die bei ungetesteten Patientenproben üblichen Vorsichtsmaßnahmen gelten auch für den Umgang mit diesem Material. Die Stopplösung besteht aus 1 N saure Lösung. Dies ist eine starke Säure. Obwohl sie verdünnt ist, ist sie mit Sorgfalt zu handhaben. Sie kann Verätzungen verursachen. Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Schutzkleidung sind zu tragen. Verschüttete Säure ist vor dem Aufwischen mit großen Mengen Wasser zu verdünnen. Dämpfe nicht einatmen.

7 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung von intaktem PTH sollte mit EDTA-Plasma oder Serum erfolgen. Es wurde festgestellt, dass PTH in EDTA-Plasma erheblich stabiler als in Serum ist⁶. Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, werden 50 µL Serum oder EDTA-Plasma benötigt. Vollblut in einem Reagenzglas ohne Antikoagulanzen bzw. violetten Stopfen [EDTA] sammeln. Nach Gerinnung des Bluts sind Serum bzw. Plasma sofort zu trennen, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, und bei -20 °C oder kälter zu lagern. Serumproben können bei 2 °C - 8 °C bis zu 8 Stunden gelagert werden. Auf -20 °C tiefgefrorene Serumproben sind bis zu 4 Monate stabil.

8 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Nach Zustellung und vor Verwendung alle Testkit-Komponenten bei 2 °C - 8 °C lagern.

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. Jeden der Kalibratoren (Kalibrator A bis F) und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 500 µL des Reagenz 4 (Rekonstitutionslösung) rekonstituieren und mischen. Flasche 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -20 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.
3. Reagenz A: Waschkonzentrat: Inhalt gründlich mischen. Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist der Niederschlag durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad bei 37 °C oder einen Laborofen und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 mL) zu 570 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

9 TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) PTH-Kalibratoren, A – F der Intakt-PTH-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf dem QC Datenblatt vermerkt], Qualitätskontrollseren und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen. Lassen Sie mindestens 2 Vertiefungen für den Leerwert (Blank) frei. Siehe Schritt #9 dieses Kapitels.
2. **25 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehene bzw. gekennzeichnete Vertiefung pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).**
3. **50 µL** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
4. **50 µL** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten. Platte **3 Stunden ± 30 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen, anschließend jede der Vertiefungen fünf (5) Mal mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf 0,35 mL je Vertiefung einzustellen.
6. **150 µL** des Reagenz B (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
8. **100 µL** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Vorsichtig mischen.
9. Innerhalb von 10 Minuten Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät gegen den Leerwert messen. Vor der Messung sicherstellen, dass die vorgesehenen Vertiefungen für den Leerwert (siehe Schritt #1) mit 250 µL destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllt sind. Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen.
Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 700 – 1 000 pg/mL) auszudehnen. Somit können Patientenproben mit PTH > 200 pg/mL gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Im Allgemeinen sind Patienten- und Kontrollproben bei PTH-Konzentrationen von bis zu 200 pg/mL bei 450 nm abzulesen. PTH-Konzentrationen oberhalb von 200 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.
10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte kann eine Kalibrationskurve mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der intakten PTH-Konzentration erstellt werden.

9.1 Verfahrenstechnische Hinweise

- Intaktes PTH 1-84 ist ein sehr instabiles Molekül. Sofort nach Rekonstitution bzw. Auftauen sämtlicher Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit dem Test beginnen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen. Für die Datenreduktion und die Berechnung der Ergebnisse sind dann die mittleren Absorptionseinheiten der doppelbestimmten Reihen zu verwenden.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden. Dies wird durch Umkehren des Pipettiervorgangs erreicht, wie in der Pipetten-Packungsbeilage beschrieben.
- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F), ca. 700 – 1 000 pg/mL (genaue Konzentrationsangabe auf dem QC Datenblatt), sind mit Reagenz 3 (Probenverdünnungspuffer) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Nur Reagenzien einer Charge verwenden.
- Alternativ können für den Test ausreichende Mengen Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) und Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) zu gleichen Teilen in einer sauberen brauntransparenten Flasche gemischt werden. Anschließend 100 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4). Darauf folgt die Inkubation im Orbitalschüttler.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

10.1 Manuell

1. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d.h. Kalibrator A, B, C, D und E. Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der drei Kalibratoren mit den höchsten Konzentrationen, d.h. Kalibrator D, E und F.
2. Jedem Kalibrator die auf dem Fläschchen in pg/mL angegebene Konzentration zuweisen. Daten der Kalibrationskurve auf Millimeterpapier übertragen, wobei die Konzentration auf der X-Achse gegen die entsprechende Absorptionseinheit auf der Y-Achse aufzutragen ist.
3. Zwei nebeneinander liegende Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Dieser mathematische Algorithmus wird als lineare Interpolation bezeichnet. Die Probenkonzentration ist durch Feststellung der Absorptionseinheit auf der Y-Achse und des zugehörigen Konzentrationswerts auf der X-Achse zu ermitteln. Patienten- und Kontrollproben sind bei PTH-Konzentrationen von bis zu 200 pg/mL bei 450 nm zu messen. PTH-Konzentrationen oberhalb von 200 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

10.2 Automatisch

Computerprogramme, die mit kubischen Splines oder 4 PL [4-Parameter Logistik] arbeiten, liefern erfahrungsgemäß gute Ergebnisse.

Beispieldaten bei 450 nm [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser

	1. Messung Absorptions- einheit	2. Messung Absorptions- einheit	Mittlere Ab- sorptions- einheit	Intaktes PTH pg/mL	Intaktes PTH pg/mL – Anzugegebenes Ergebnis
Kalibrator A	0.020	0.016	0.018		0
Kalibrator B	0.056	0.051	0.054		7
Kalibrator C	0.124	0.119	0.122		18
Kalibrator D	0.388	0.393	0.391		55
Kalibrator E	1.335	1.340	1.338		210
Kontrolle 1	0.200	0.200	0.200	27.6	27.6
Kontrolle 2	0.804	0.794	0.799	119	119
Patientenprobe1	0.147	0.136	0.142	19.1	19.1
Patientenprobe2	0.407	0.409	0.408	58.5	58.5
Patientenprobe3	2.375	2.454	2.415	> 200	*
Patientenprobe4	3.725	3.725	3.725	> 200	*

* Da die gemessene Konzentration > 200 pg/mL ist, sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten** bei 405 nm aufgeführt sind.

Beispieldaten bei 405 nm [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

	1. Messung Absorptions- einheit	2. Messung Absorptions- einheit	Mittlere Ab- sorptions- einheit	Intaktes PTH pg/mL	Intaktes PTH pg/mL – Anzugegebenes Ergebnis
Kalibrator A	0.014	0.008	0.011		0
Kalibrator D	0.124	0.128	0.126		55
Kalibrator E	0.428	0.425	0.427		210
Kalibrator F	1.309	1.317	1.313		700
Kontrolle 1	0.074	0.066	0.070	< 200	¶
Kontrolle 2	0.260	0.251	0.256	121	π
Patientenprobe1	0.049	0.043	0.046	< 200	¶
Patientenprobe2	0.132	0.133	0.133	< 200	¶
Patientenprobe3	0.758	0.782	0.770	401	401
Patientenprobe4	1.314	1.321	1.318	> 700	⇐

¶ Für Proben mit einem Messwert < 200 pg/mL sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, wie sie oben in der Tabelle **Beispieldaten** bei 450 nm aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.

π Obwohl der Messwert für Kontrolle (2) < 200 pg/mL ist, wird empfohlen, das tatsächliche Ergebnis zu übernehmen und für eine Auswertung in der Qualitätskontrolle aufzuzeichnen. Darüber hinaus ist die Absorption für Kontrolle (2) ausreichend hoch, um für die Analyse von Bedeutung zu sein.

⇐ Der Absorptionswert liegt außerhalb des Messbereichs oder ist höher als die mittlere Absorption des höchsten Kalibrators. Die Probe ist zu verdünnen und erneut zu testen.

HINWEIS: Die verwendeten Daten dienen lediglich zur Illustration. Sie sind nicht anstelle der während der Testdurchführung ermittelten Daten zu verwenden.

11 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollseren oder Serumpools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mithilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Liegen bei einem Test einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, sind die Ergebnisse der Patientenproben möglicherweise ungültig.

12 GRENZEN DES VERFAHRENS

Der DEMEDITEC PTH ELISA Testkit zeigt keinen „High-dose-hook-Effekt“ bei Proben, die mit 2.100.000 pg/mL intaktem PTH versetzt sind. Proben mit intakten PTH-Konzentrationen höher als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind intakte PTH-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren.

13 ERWARTETE WERTE

Mithilfe des Intakt-PTH ELISA wurden in den USA 148 scheinbar gesunden Probanden intakte PTH-Konzentrationen gemessen.

Die ermittelten Werte lagen in einem Bereich von 9,0 bis 94 pg/mL für Serum.

Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzesverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung.

Das geometrische Mittel + 2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab einen Bereich von 10,4 bis 66,5 pg/mL für Serum.

14 LEISTUNGSMERKMALE**14.1 Genauigkeit**

Drei hundert neun (309) Patientenproben mit intakten PTH-Werten zwischen 1,0 und 833 pg/mL wurden durch den vorherigen DEMEDITEC PTH ELISA und den aktualisierten DEMEDITEC PTH ELISA getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

DEMEDITEC ELISA = 1,06 – 1,49 pg/mL	r = 0,998	N = 309
-------------------------------------	-----------	---------

14.2 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze dieses Tests ist als der kleinste Wert definiert, der auf Basis des 95%-Vertrauensbereichs vom Nullstandard unterschieden werden kann.

Der DEMEDITEC PTH ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,57 pg/mL.

14.3 Spezifität und Querempfindlichkeit

Die im DEMEDITEC PTH ELISA verwendeten Antikörper wurden affinitätschromatographisch gereinigt und sind für hinreichend definierte Regionen des PTH-Moleküls spezifisch. Der mit Peroxidase markierte Antikörper erkennt nur die N-terminale Region bzw. die Aminosäuresequenz 1-34 des PTH-Moleküls, während der biotinylierte Antikörper für die Sequenz 39-84 spezifisch ist. Entsprechend kann nur intaktes PTH, welches eine Bindung sowohl durch den enzymgekoppelten als auch den biotinylierten Antikörper erfordert, in diesem Test nachgewiesen werden.

Um die Spezifität des Tests zu gewährleisten, wurden Enzymkoppelung und Biotinylierung sowie deren molare Verhältnisse optimiert, um den Nachweis von PTH-Fragmenten zu minimieren. Humanes PTH 1-34 in Konzentrationen bis zu 300 pg/mL und C-terminale Fragmente 39-84 in Konzentrationen bis zu 300 000 pg/mL ergeben jeweils eine molare Querempfindlichkeit gegenüber PTH von weniger als 2 % bzw. 0,02 %.

14.4 Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision (Intra-Assay-Abweichung) des DEMEDITEC PTH ELISA wurde durch 25 wiederholte Messungen jeder der beiden Proben ermittelt.

Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	32,4	25	6,08
B	178,2	25	3,68

Die Gesamtpräzision (Inter-Assay-Abweichung) des DEMEDITEC PTH ELISA wurde durch die Bestimmung von zwei Proben in 21 Testansätzen ermittelt. Die Tests wurden von drei Labortechnikern unter Verwendung von Reagenzien aus drei verschiedenen Chargen durchgeführt.

Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	30,3	21	3,6
B	159,1	21	2,8

14.5 Wiederfindung

Drei verschiedene Patientenserum wurden zur Bestimmung der Wiederfindung mit unterschiedlichen Mengen PTH versetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Serumprobe	Endogenes PTH (pg/mL)	PTH zugesetzt (pg/mL)	Erwarteter Wert (pg/mL)	Gemessener Wert (pg/mL)	Wiederfindung (%)
A	32,7	132	165	168	102%
	20,6	264	285	288	101%
	13,5	396	410	413	101%
B	68,6	132	201	191	95%
	51,7	264	316	344	109%
	45,0	396	441	462	105%
C	19,9	132	152	165	109%
	15,4	264	279	275	99%
	13,3	396	409	424	104%

14.6 Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität

Vier Patientenserumproben wurden mit Reagenz 3 (Verdünnungspuffer für Patientenproben mit Werten außerhalb des Messbereichs) verdünnt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in pg/mL dargestellt:

Probe	Verdünnung	Erwartet	Beobachtet	% Beobachtet / Erwartet
A	Unverdünnt	-	322	-
	1:2	161	148	92%
	1:4	80,5	73,1	91%
	1:8	40,3	41.5	103%
B	Unverdünnt	-	230	-
	1:2	115	97	84%
	1:4	58	55	95%
	1:8	29	30	103%
C	Unverdünnt	-	176	-
	1:2	88	82	93%
	1:4	44	45	102%
	1:8	22	24	109%
D	Unverdünnt	-	426	-
	1:2	213	192	90%
	1:4	107	90	84%
	1:8	53	47	89%

15 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA

1. Segre, G.V., Niall H.D., Habener J.F. et. al. : Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance. *Am. J. Med.* 56: 774,1974.
2. Mallette, L.E., Gagel, R.F.: Parathyroid Hormone and Calcitonin. In: Murray J.F. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 65-69, 1990.
3. Bilezikian, J.P.: Primary Hyperparathyroidism. In: Murray J.F. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 109-111, 1990.
4. Stewart, A.F.: Humoral Hypercalcemia of Malignancy. In: Murray J.F. (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Kelseyville; William Byrd Press, Richmond, pp. 115-118, 1990.
5. Mallette, L.E.: The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action. *Endocrin. Rev.* 12:110-117, 1991.
6. Kruger, L., Rosenblum, S., Zaazra, J. and Wong, J. Intact PTH is stable in unfrozen EDTA plasma for 48 hours prior to laboratory Analysis. *Clin. Chem.* 41:6: page S47, 1995.
7. Raisz, L.G., Yajnik, C.H., Bockman, R.S., and Bower, B.B.: Comparison of commercially available parathyroid hormone immunoassay in the differential diagnosis of hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism or malignancy. *Ann. Intern. Med.* 91:739-740, 1979.
8. Endres, D., Brickman, A., Goodman, W., Maloney, D., and Sherrard, D.: N-Terminal PTH radioimmunoassays in assessment of renal osteodystrophy. *Kidney International.* 21:132, 1982.
9. Dambacher, M.A., Fischer, J.A., Hunziker, W.H., et.al.: Distribution of circulating immunoreactive components of parathyroid hormone in normal subjects and in patients with primary and secondary hyperparathyroidism: the role of kidney and of the serum calcium concentration.,*Clin. Sci.* 57:435,1979.
10. Kao, P.C., Jiang, N.S., Klee, G.G., and Purnell, D.C.: Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH).,*Clin. Chem.* 28:69, 1982.
11. Endres, D.B., Villanueva, R., Sharp, C.F. Jr, Singer, F.R.: Measurement of parathyroid hormone.,*Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 18:611-629,1989.
12. Kao, P.C., van Heerden, J.A., Grant, C.S., Klee, G.G., Khosla S: Clinical performance of parathyroid hormone immunometric assays.,*Mayo Clin. Proc.* 67:637-645, 1992.
13. Marcus, R.: Laboratory diagnosis of primary hyperparathyroidism.,*Endocrinol Metab. Clin. North Am.* 18:647-658, 1989.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità