

C-terminal PTH

¹²⁵I RIA Kit

For the quantitative determination of
C-terminal Human Parathyroid Hormone

Instruction Manual

Manual de Instrucciones
Manuale di Istruzione

REF: 13065, 13130

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English	Page 1
Español	12
Italiano.....	25

C-TERMINAL PTH RADIOIMMUNOASSAY

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

This kit contains instructions and materials for the quantitative determination of C-terminal human parathyroid hormone (hPTH) in serum or plasma by radioimmunoassay (RIA).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Native parathyroid hormone is an eighty-four amino acid peptide which acts to increase serum calcium by specific effects in soft tissue and bone metabolism. Parathyroid peptides are secreted from small glands in response to a decrease of serum calcium. High levels of serum calcium generally inhibit PTH secretion, except in the case of PTH secreting tumors. PTH circulates at a relatively low concentration; therefore, sensitive radiometric techniques are needed to measure PTH in blood.

Clinically, the measurement of PTH has proven to be an extremely helpful and efficient tool in the differential diagnosis and management of hypercalcemia; more specifically, PTH measurement can help the physician diagnose tumors and hyperplasia of the parathyroid glands.¹ Radioimmunoassay detection of high blood levels of PTH can often establish that excess PTH secretion is causing hypercalcemia.² PTH can also be useful in localizing hyperfunctioning parathyroid tissue by RIA of samples obtained via venous catheterization.³ The PTH radioimmunoassay is also useful for the diagnosis and management of hypocalcemia. With rare exceptions, hypocalcemic persons with deficient PTH (hypoparathyroidism) have subnormal concentrations of PTH.⁴ Measurement of serum PTH is frequently used to assess the status of renal osteodystrophy in renal failure patients on chronic dialysis.⁵ Serum PTH levels are often markedly elevated in patients with renal failure due to chronic negative calcium balance, hyperphosphatemia, and hypocalcemia with subsequent secondary hyperparathyroidism.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin C-terminal RIA is a disequilibrium procedure using delayed tracer addition to increase sensitivity. The antibody was produced against intact beef PTH and is reactive to the 65-84 sequence of human PTH. The antibody has an affinity constant of 1×10^{10} L/mole. In this RIA, sample and first antibody are combined and incubated for 16-24 hours (Option A) or 4 hours (Option B) at 2-8°C. Tracer is then added, followed by a second incubation for 16-24 hours at 2-8°C. Separation is accomplished by use of pre-precipitated double antibody which is accelerated with PEG. The pre-precipitated antibody is added as a single reagent with a subsequent incubation of two hours. The calibrators are expressed in terms of the mass of human PTH 1-84 in ng/mL. Quality control will be performed at DiaSorin using only Option B.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

C-Term PTH Calibrator 0	1 vial/20 mL	1 vial/20 mL
C-Term PTH Calibrators 1-6	6 vials/1.0 mL	6 vials/1.0 mL
C- Term PTH Antiserum	1 vial/14 mL	2 vials/14 mL
¹²⁵ I C-Term PTH Tracer	1 vial/14 mL	2 vials/14 mL
C-Term PTH Controls	2 vials/ 1.0 mL	2 vials/ 1.0 mL
C-Term PTH Precipitating Complex	1 vial/ 35 mL	2 vials/ 35 mL
Number of tests	65	130

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After reconstitution store each reagent at -15°C or lower until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 C-terminal PTH Calibrator 0: lyophilized reagent

BSA-borate buffer with sodium azide (0.2%) and other stabilizers added. Reconstitute the vial with 20 mL of purified water and allow it to stand for 15-20 minutes until completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.2 C-terminal hPTH Calibrators (1-6): lyophilized reagent

Synthetic hPTH 65-84 calibrators, at nominal concentrations ranging from 0.312 to 10 ng/mL (31.2-1000 pmol/L), are pre-diluted in Calibrator 0 containing sodium azide (0.1%) and other stabilizers. Exact concentration values are assigned according to each lot. Reconstitute each vial with 1.0 mL of purified water and allow it to stand for 15-20 minutes until completely dissolved; mix thoroughly before using. The DiaSorin synthetic hPTH 65-84 calibrator has been calibrated against the World Health Organization (W.H.O.) preparation 79/500. Any comparison with other products or procedures should be done with this reference standard. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

4.3 C-terminal PTH Antiserum: lyophilized reagent

Chicken anti-human parathyroid hormone antibody diluted in BSA-borate buffer with sodium azide (0.1%) added. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water and allow it to stand for 15-20 minutes until completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.4 ¹²⁵I C-terminal PTH: lyophilized reagent

Synthetic human C-terminal PTH, labeled with iodine-125 and diluted in BSA-borate-EDTA buffer with sodium azide (0.4%) added. Reconstitute the vial with 14 mL of purified water and allow it to stand for 15-20 minutes until completely dissolved; mix thoroughly before using.

4.5 C-terminal PTH Precipitating Complex: lyophilized reagent

Normal chicken serum pre-precipitated with rabbit or goat anti-chicken serum and polyethylene glycol (PEG), diluted in BSA-borate buffer with sodium azide (0.3%) added. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water; mix thoroughly until the suspension appears homogeneous and then allow the vial to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing.

4.6 C-terminal PTH Controls, Level 1 and 2: lyophilized reagent

Human serum spiked, if necessary, with the appropriate amount of synthetic hPTH 65-84 to obtain a concentration within a specified range. Sodium azide (0.1%) and other stabilizers are added. Reconstitute the vial with 1.0 mL of purified water and allow it to stand for 15 - 20 minutes until completely dissolved; mix thoroughly and treat as an unknown sample.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg and antibody to HIV. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus, Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4TH ed., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control, Atlanta, GA, U.S. 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

The kits contain radioactive material not exceeding 1.5 μCi (55.5 kBq) of iodine-125 for kit No. 13065 or 3 μCi (111 kBq) of iodine-125 for kit No. 13130. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

- 6.1 The presence of particulate matter in any of the reagents.
- 6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.3 A decrease in maximum binding.
- 6.4 A high nonspecific binding.

7. COLLECTION AND PREPARATION OF SERUM AND PLASMA

One hundred microliters of serum or EDTA plasma, in duplicate, are required for use in the C-terminal PTH assay.

For serum, collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. Allow the blood to clot at room temperature (15°C-25°C). For plasma, collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. EDTA (7.2 mg/5 mL blood) is used as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes using approximately 760 x g* to obtain hemolysis free sera. No additives or preservatives are required to maintain integrity of the sample. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination. A fasting specimen is recommended but not required. Serum or plasma samples should be stored frozen for best results. Studies indicate that C-terminal PTH specimens are stable for at least 3-6 months at -20°C. Specimens should not be repeatedly frozen and thawed.

8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED.

- 8.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.
- 8.2 Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes.
- 8.3 Gamma scintillation counter capable of counting ¹²⁵I.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Pipetting devices:
 - a. Micropipettors calibrated to deliver 100 µL, 200 µL, and 500 µL.
 - b. Repeating dispensers, calibrated to deliver 200 µL and 500 µL.
- 8.6 Purified water.

9. ASSAY PROCEDURE – OPTION A

- 9.1 Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures above 20-25°C. Mix gently before using.
- 9.2 Set up labeled 12 x 75 mm glass tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the back page.
- 9.3 Add reagents to the tubes as follows:
 - a. **Total Count Tubes**
Set aside until step number 5
 - b. **Nonspecific Binding (NSB)**
100 µL of calibrator 0
 - c. **Calibrator 0**
100 µL of calibrator 0
200 µL of C-terminal PTH antiserum
 - d. **Calibrators (1-6)**
100 µL of PTH calibrator
200 µL of C-terminal PTH antiserum
 - e. **Controls and Unknown Samples**
100 µL of serum
200 µL of C-terminal PTH antiserum
- 9.4 Vortex gently without foaming and incubate at 2-8°C for 16-24 hours.
- 9.5 Add 200 µL of ¹²⁵I PTH to all tubes.
- 9.6 Vortex gently without foaming and incubate at 2-8°C for 16-24 hours.
- 9.7 Add 500 µL of precipitating complex to all tubes except the total count tubes.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

- 9.8 Vortex gently without foaming and incubate for two hours (± 15 minutes) at 2-8°C.
- 9.9 Centrifuge the tubes using a minimum of 760 x g* for 20 minutes at 2-8°C or 20-25°C.
- 9.10 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a maximum of two minutes. Blot the tubes on absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.
- 9.11 In a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for a sufficient time to achieve statistical accuracy. (See Limitations of the Procedure section.)

10. ASSAY PROCEDURE – OPTION B

- 10.1 Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen reagents to thaw completely. Do not allow reagents to reach temperatures above 20-25°C. Mix gently before using.
- 10.2 Set up labeled 12 x 75 mm glass tubes in duplicate according to the protocol in TABLE II.
- 10.3 Add reagents to the tubes as follows:
 - a. **Total Count Tubes**
Set aside until step number 5
 - b. **Nonspecific Binding (NSB)**
100 μ L of calibrator 0
 - c. **calibrator 0**
100 μ L of calibrator 0
200 μ L of C-terminal PTH antiserum
 - d. **Calibrators (1-6)**
100 μ L of PTH calibrator
200 μ L of C-terminal PTH antiserum
 - e. **Controls and Unknown Samples**
100 μ L of serum
200 μ L of C-terminal PTH antiserum
- 10.4 Vortex gently without foaming and incubate at 2-8°C for 4 hours (± 15 minutes).
- 10.5 Add 200 μ L of 125 I PTH to all tubes.
- 10.6 Vortex gently without foaming and incubate at 2-8°C for 16-24 hours.
- 10.7 Add 500 μ L of precipitating complex to all tubes except the total count tubes.
- 10.8 Vortex gently without foaming and incubate for two hours (± 15 minutes) at 2-8°C.
- 10.9 Centrifuge the tubes using a minimum of 760 x g* for 20 minutes at 2-8°C or 20-25°C.
- 10.10 Immediately decant the supernatant from all the tubes except the total count tubes by inverting them for a maximum of two minutes. Blot the tubes on absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.
- 10.11 In a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for a sufficient time to achieve statistical accuracy. (See Limitations of the Procedure section.)

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$

11. PROCEDURAL COMMENTS

- 11.1 Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.
- 11.2 Some manufacturers' disposable borosilicate glass tubes yield elevated nonspecific bindings.
- 11.3 If you choose to aspirate supernatant from the precipitate, be careful not to disturb the precipitate pellet.
- 11.4 To completely monitor the consistent performance of an RIA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters to assure consistent kit performance:
 - a. **Total Counts**
 - b. **Maximum Binding**
Average counts per minute (CPM) of Calibrator 0 Tubes/Average CPM of Total Count Tubes.
 - c. **Nonspecific Binding**
Average CPM of NSB Tubes/Average CPM of Total Count Tubes.

12. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two controls in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ± 2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the controls included in this kit using Option B. These ranges are printed on the control vials.

13. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating the results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either linear or logarithmic scale. Each of these methods give essentially the same values for controls and samples; although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is % B/B₀ versus log concentration.

- 13.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control, and unknown sample.
- 13.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.
- 13.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control, or unknown sample by the corrected CPM of the Calibrator 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of Calibrator 0} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

- 13.4 Using 2-cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B₀ for the PTH calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).
- 13.5 Draw a best-fit line through the points.
- 13.6 Interpolate the levels of PTH in the samples from the plot.
- 13.7 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted appropriately with Calibrator 0 and assayed again.
- 13.8 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.
- 13.9 Calculate maximum binding by dividing CPM of Calibrator 0 by the average total counts obtained in the total count tubes.

REDUCTION DATA

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

TABLE III
DiaSorin C-terminal PTH RIA Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent (B/T)	Percent Bound (B/B ₀)	Conc. (ng/mL)
Total Count	15,724 15,738	15,731				
NSB	302 360	331		2.1		
Calibrator 0	7,262 7,124	7,193	6,862	45.7	100	
Calibrators (ng/mL)						
1 (0.32)	6,734	6,702 6,669	6,371		92.8	
2 (0.62)	6,358	6,392 6,425	6,061		88.3	
3 (1.44)	5,566 5,656	5,611	5,280		76.9	
4 (2.93)	4,139 4,074	4,105	3,774		55.0	
5 (6.03)	2,173	2,195 2,217	1,864		27.2	
6 (11.6)	753 745	749	418		6.1	
Unknown Samples						
1	4,463 4,522	4,493	4,162		60.7	2.48
2	6,382 6,466	6,424	6,093		88.8	0.64

Typical sample data and a calibrator curve for Option B are shown in TABLE III and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

C-TERMINAL PTH SAMPLE CALIBRATOR CURVE

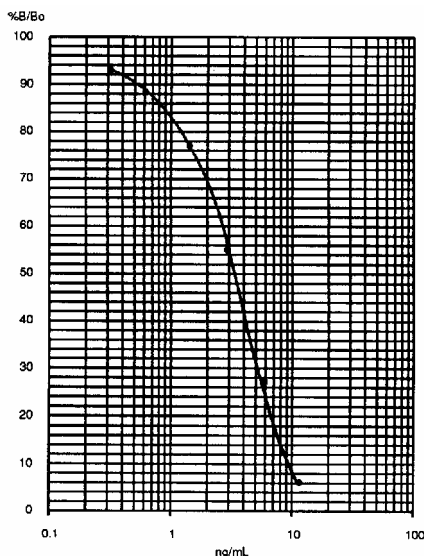


FIGURE 1

14. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 14.1 If the initial concentration of an unknown sample is greater than the highest calibrator, dilute with Calibrator 0 only.
- 14.2 Counting times should be sufficient to prevent statistical error, for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error.
- 14.3. Recent studies have shown that if the second antibody incubation is performed at 2-8°C instead of 20-25°C, a substantial increase in zero binding will result. If centrifugation is performed at 20-25°C, the temperature must be controlled so that it does not exceed 25°C.

15. EXPECTED VALUES

Normal Range

Each laboratory should establish its own normal range. Normal values observed in the DiaSorin Laboratory were 0.44 ± 0.22 ng/mL (44.4 ± 22.0 pmol/L). This would lead to a normal range (two std. dev.) of nondetectable (ND) - 0.88 ng/mL (ND - 88 pmol/L).

Interpretation of Clinical Values

Values for C-terminal PTH fragments in primary hyperparathyroidism are generally above normal, although, as with all other C-terminal PTH assays, there can be overlap of pathological values with normal values. Uremic sera will give vastly elevated values for C-terminal PTH.

TABLE IV shows the data for 16 proven primary hyperparathyroid patients and two parathyroidectomized individuals on vitamin D and calcium. In 87% of these cases, there was clear separation from normal, and the hypoparathyroid patients were in the undetectable range.

In hypercalcemia of malignancy C-terminal PTH is not generally elevated out of the normal range in contrast to primary hyperparathyroidism, although with calcium levels less than 11.5 mg/dL there is overlap of these two disease states.

TABLE IV
 C-terminal PTH Values in Sera from
 Surgically Proven Parathyroid Adenomas
Units
 Calcium: mg/dL
 PTH: ng/mL (1-84 equivalents)
Parathyroid Adenoma

Sample No.	Calcium	PTH	Sample No.	Calcium	PTH
1	12.4	2.6	9	12.4	5.9
2	10.7	2.1	10	11.0	2.0
3	11.2	1.3	11	11.3	2.2
4	10.9	3.0	12	10.8	0.8
5	11.3	3.8	13	11.2	2.0
6	13.0	3.4	14	10.8	2.4
7	11.1	1.9	15	11.0	2.9
8	12.2	1.0	16	12.8	2.8
			Mean	11.5	2.5
			Std. Dev.	0.78	1.2

Hypoparathyroid (treated)

Sample No.	Calcium	PTH
1	8.4	<0.3
2	9.2	<0.3

15. PERFORMANCE DATA

15.1 Precision

Within Assay Variation (values = ng/mL)

	Mean Value	S.D.	%C.V.
LOW	0.4	0.02	5.0
MEDIUM	2.8	0.13	4.6
HIGH	5.6	0.28	5.0

Between Assay Variation (values = ng/mL)

	Mean Value	S.D.	%C.V.
LOW	0.7	0.10	14.3
HIGH	5.1	0.41	8.0

15.2 Trueness: The assay trueness has been checked by the linearity test and the recovery test.

Linearity (Parallelism)

Serial Dilution Study of 4 Patient Samples (values = ng/mL)

Sample No.	Undiluted	1/2	1/4
1	5.6	5.4	5.2
2	7.3	6.8	6.8
3	10.0	9.0	8.8
4	>10	10.8	10.4

Recovery

Recovery Study (values = ng/mL)

Background	Calibrator Added	Expected Value	Measured Value	Percent Recovery
Set No. 1				
0.4	1.3	1.7	1.7	100
0.4	2.5	2.9	3.1	107
0.4	5.0	5.4	4.9	91
Set No. 2				
0.3	1.3	1.6	1.7	106
0.3	2.5	2.8	2.7	96
0.3	5.0	5.3	5.3	100
Set No. 3				
0.4	1.3	1.7	1.9	112
0.4	2.5	2.9	2.9	100
0.4	5.0	5.4	5.4	100

15.3 Analytical Sensitivity

When defined as the apparent concentration at three standard deviations from the counts at maximum binding, the minimum detectable amount is 0.01 ng/tube (0.1 ng/mL) if the first incubation is 24 hours, and 0.02 ng/tube (0.2 ng/mL) if the first incubation is 4 hours.

15.4 Analytical Specificity

Comparison of the cross-reactivity of C-terminal PTH antibody was made with the following peptides at 1,000 times the top calibrator for C-terminal PTH:

Peptide	% Cross-reactivity
bPTH	100
hPTH 65-84	100
hCalcitonin	<0.01
hProlactin	<0.01
hFSH	<0.01
hLH	<0.01
hTSH	<0.01
Thyroxine (T ₄)	<0.01

15.5 Interference

Interference studies were performed using NCCLS EP7-A as a guideline to assess the effects of common endogenous interferents. Values obtained demonstrated interference due to the addition of Tryglycerides, cholesterol and hemoglobin.

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

Option A

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Do not allow any reagents to reach above 20-25°C.
2. Identify tubes in duplicate.
3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
Calibrator 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibrators (1-5)	-		100 µL	-
Controls	-	-	-	100 µL
Unknown	-	-	-	100 µL
Samples				
Antiserum			200 µL	200 µL

4. Mix well; incubate for 16-24 hours at 2-8°C.
5. Dispense 200 µL of Tracer into all wells.
6. Mix well; incubate for 16-24 hours at 2-8°C.
7. Dispense 500 µL Precipitating Complex into all wells except the Total Count tubes.
8. Mix well, incubate for 2 hours (+/- 15 minutes) at 2-8°C.
9. Centrifuge using 760 x g* for 20 minutes.
10. Decant the supernatants.
11. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

SCHEME OF THE ASSAY

Option B

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Do not allow any reagents to reach above 20-25°C.
2. Identify tubes in duplicate.
3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
Calibrator 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibrators (1-5)	-		100 µL	-
Controls	-	-	-	100 µL
Unknown	-	-	-	100 µL
Samples				
Antiserum			200 µL	200 µL

4. Mix well; incubate for 4 hours (+/- 15 minutes) at 2-8°C.
5. Dispense 200 µL of Tracer into all wells.
6. Mix well; incubate for 16-24 hours at 2-8°C.
7. Dispense 500 µL Precipitating Complex into all wells except the Total Count tubes.
8. Mix well, incubate for 2 hours (+/- 15 minutes) at 2-8°C.
9. Centrifuge using 760 x g* for 20 minutes.
10. Decant the supernatants.
11. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

RADIOINMUNOENSAYO DE LA PTH C-TERMINAL

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

Este equipo contiene instrucciones y materiales para la determinación cuantitativa por radioinmunoensayo (RIA) de la hormona paratiroidea humana (hPTH) C-terminal en suero o plasma.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La hormona paratiroidea nativa es un péptido de 84 aminoácidos que actúa para incrementar el calcio sérico mediante efectos específicos en el tejido blando y el metabolismo óseo. Los péptidos paratiroideos son secretados por glándulas pequeñas en respuesta a una disminución del calcio sérico. Los niveles de calcio sérico altos suelen inhibir la secreción de PTH, salvo en el caso de los tumores secretores de PTH. La PTH circula a una concentración relativamente baja, por lo que se requieren técnicas radiométricas sensibles para medir la PTH en sangre.

Desde el punto de vista clínico, la medición de PTH ha demostrado ser una herramienta extremadamente útil y eficaz para el diagnóstico diferencial y el control de la hipercalcemia; de forma más específica, la medición de PTH puede ayudar al médico a diagnosticar tumores e hiperplasia en las glándulas paratiroideas.¹ La detección por radioinmunoensayo de niveles elevados de PTH en sangre a menudo permite establecer el exceso de secreción de PTH como causante de la hipercalcemia.² La PTH también puede resultar útil para la localización de tejido paratiroideo hiperactivo mediante RIA de muestras obtenidas por cateterización venosa.³ Asimismo, el radioinmunoensayo de PTH sirve para diagnosticar y controlar la hipocalcemia. Con excepciones raras, las personas hipocalcémicas con PTH deficiente (hipoparatiroidismo) tienen concentraciones de PTH inferiores a lo normal.⁴ La medición de PTH en suero se utiliza frecuentemente para evaluar el estado de osteodistrofia renal en pacientes con insuficiencia renal sometidos a diálisis crónica.⁵ A menudo, los niveles de PTH en suero son bastante elevados en los pacientes con insuficiencia renal debido a un balance cálcico negativo crónico, a hiperfosfatemia y a hipocalcemia con hiperparatiroidismo secundario posterior.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El RIA para C-terminal de DiaSorin es un procedimiento de desequilibrio que utiliza adición de trazador retardada para aumentar la sensibilidad. El anticuerpo se produjo contra PTH vacuna intacta y es reactivo a la secuencia 65-84 de la PTH humana. El anticuerpo tiene una constante de afinidad de 1×10^{10} L/mol. En este RIA, la muestra y el primer anticuerpo se combinan e incuban durante 16-24 horas (Opción A) o 4 horas (Opción B) a 2-8 °C. Después se agrega trazador, seguido de una segunda incubación durante 16-24 horas a 2-8 °C. La separación se logra mediante el uso de un anticuerpo doble pre-precipitado que se acelera con PEG. El anticuerpo pre-precipitado se añade como un solo reactivo con una incubación posterior de dos horas. Los calibradores se expresan en términos de la masa de PTH humana (1-84) en ng/mL.

El control de calidad se llevará a cabo en DiaSorin sólo con la Opción B.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibrador 0 PTH C-Term	1 vial/20 mL	1 vial/20 mL
Calibradores 1-6 PTH C-Term	6 viales/1,0 mL	6 viales/1,0 mL
Antisuero PTH C-Term	1 vial/14 mL	2 viales/14 mL
Trazador ¹²⁵ I PTH C-Term	1 vial/14 mL	2 viales/14 mL
Controles PTH C-Term	2 viales/1,0 mL	2 viales/1,0 mL
Complejo de precipitación PTH C-Term	1 vial/35 mL	2 viales/35 mL
Número de pruebas	65	130

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8 °C. Una vez efectuada la reconstitución, almacene cada reactivo a -15 °C o menos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad.

Cuando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibrador 0 PTH C-terminal: reactivo liofilizado

Tampón de borato ASB con azida sódica (0,2%) y otros estabilizadores añadidos. Reconstituya el vial con 20 mL de agua purificada y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.2 Calibradores (1-6) hPTH C-terminal: reactivo liofilizado

Calibradores hPTH 65-84 sintética, con concentraciones nominales entre 0,312 y 10 ng/mL (31,2-1000 pmol/L), prediluidos en calibrador 0 preparado con azida sódica (0,1%) y otros estabilizadores. Los valores de concentración exactos se asignan según cada lote. Reconstituya cada vial con 1,0 mL de agua purificada y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar. El calibrador hPTH 65-84 sintética de DiaSorin se ha calibrado según la preparación 79/500 de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Cualquier comparación con otros productos o procedimientos debe realizarse de acuerdo con este estándar de referencia. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico *in vitro*.

4.3 Antisuero PTH C-terminal: reactivo liofilizado

Anticuerpo PTH de gallina antihumano diluido en tampón de borato ASB con azida sódica (0,1%) añadida. Reconstituya el vial con 14 mL de agua purificada y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.4 ¹²⁵I PTH C-terminal: reactivo liofilizado

hPTH C-terminal sintética, marcada con yodo 125 y diluida en tampón de borato ASB EDTA con azida sódica (0,4%) añadida. Reconstituya el vial con 14 mL de agua purificada y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo antes de utilizar.

4.5 Complejo de precipitación PTH C-terminal: reactivo liofilizado

Suero de gallina normal pre-precipitado con suero de conejo o cabra antigallina y polietilenglicol (PEG), y diluido en tampón de borato ASB con azida sódica (0,3%) añadida. Reconstituya el vial con 35 mL de agua purificada; mezcle a fondo hasta homogeneizar la suspensión y deje reposar durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, mezclando cada cierto tiempo.

4.6 Controles PTH C-terminal, niveles 1 y 2: reactivo liofilizado

Suero humano preparado, en caso necesario, con la cantidad adecuada de hPTH 65-84 sintética para obtener una concentración dentro de un rango específico. Azida sódica (0,1%) y otros estabilizadores añadidos. Reconstituya el vial con 1,0 mL de agua purificada y deje reposar durante 15-20 minutos hasta que el contenido se disuelva por completo; mezcle a fondo y trate la muestra como desconocida.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátelos como sustancias potencialmente infecciosas.

Todas las unidades de suero/plasma de donante usadas en la preparación de este producto se han comprobado mediante métodos aprobados por la FDA estadounidense, demostrando no ser reactivas para la presencia de AgsHB y anticuerpos de VIH. Aunque estos métodos son altamente precisos, no puede garantizarse que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no exista prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano deben manejarse de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4^a ed., mayo de 1999 o actual, para centros de control y prevención de enfermedades/institutos nacionales de la salud de EE.UU.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Antes de desecharlos, enjuague con abundante agua para evitar la acumulación de azidas. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" en el manual Guide-Safety Management núm. CDC-22 publicado por los centros de control y prevención de enfermedades, Atlanta, GA, EE.UU. 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

R20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO 125

Los equipos contienen material radioactivo no superior a 1,5 μCi (55,5 kBq) de yodo 125 para el equipo núm. 13065 o a 3 μCi (111 kBq) de yodo 125 para el equipo núm. 13130. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y las prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear de EE.UU. o el estado con el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.

5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjugarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS DEL EQUIPO

- 6.1 Presencia de partículas en alguno de los reactivos.
- 6.2 Desviación en la pendiente o posición de la curva de calibración con respecto al resultado habitual.
- 6.3 Disminución de la unión máxima.
- 6.4 Alto nivel de unión no específica.

7. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DEL SUERO Y EL PLASMA

Se requieren cien microlitros de suero o plasma con EDTA, en duplicado, para su uso en el ensayo de PTH C-terminal.

Para obtener el suero, recoja una muestra de sangre por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 o 10 mL. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (15 - 25 °C). Para obtener el plasma, recoja una muestra de sangre por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 o 10 mL. EDTA (7,2 mg/5 mL de sangre) se emplea como anticoagulante. Centrifugue durante 15 minutos con aproximadamente $760 \times g^*$ para obtener suero no hemolizado. Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservantes. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con el espécimen deben estar completamente limpios de contaminación. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible.

Las muestras de suero o plasma deben congelarse para obtener resultados óptimos. Determinados estudios indican que los especímenes de PTH C-terminal son estables durante al menos 3-6 meses a -20 °C. Los especímenes no deben someterse repetidamente a ciclos de congelación y descongelación.

8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 8.1 Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrífuga controlada por temperatura con capacidad para 12 tubos de 75 mm.
- 8.3 Contador de centelleo de rayos gamma válido para yodo ¹²⁵I.
- 8.4 Vórtex.
- 8.5 Dosificadores:
 - a. Micropipetas calibradas para suministrar 100 µL, 200 µL y 500 µL.
 - b. Dispensadores repetitivos con puntas calibradas para suministrar 200 µL y 500 µL.
- 8.6 Agua purificada.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

9. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO – OPCIÓN A

- 9.1 Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los reactivos congelados que hubiera. No deje que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 20-25 °C. Mezcle con suavidad antes de usar.
- 9.2 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos de vidrio de 75 mm según el programa de ensayo de la última página.
- 9.3 Agregue reactivos a los tubos como sigue:
 - a. **Tubos de cuentas totales**
Reservar aparte hasta el paso 5
 - b. **Unión no específica (NSB)**
100 µL de calibrador 0
 - c. **Calibrador 0**
100 µL de calibrador 0
200 µL de antisuero PTH C-terminal
 - d. **Calibradores (1-6)**
100 µL de calibrador PTH
200 µL de antisuero PTH C-terminal
 - e. **Controles y muestras desconocidas**
100 µL de suero
200 µL de antisuero PTH C-terminal
- 9.4 Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube a 2-8 °C durante 16-24 horas.
- 9.5 Añada 200 µL de PTH ¹²⁵I a todos los tubos.
- 9.6 Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube a 2-8 °C durante 16-24 horas.
- 9.7 Añada 500 µL de complejo de precipitación a todos los tubos salvo a los de cuentas totales.
- 9.8 Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube durante dos horas (±15 minutos) a 2-8 °C.
- 9.9 Centrifugue los tubos usando un mínimo de 760 x g* durante 20 minutos a 2-8 °C o 20-25 °C.
- 9.10 Decante inmediatamente el sobrenadante de todos los tubos, salvo los de las cuentas totales, invirtiéndolos durante dos minutos como máximo. Antes de poner los tubos boca arriba, séquelos con papel secante para eliminar cualquier gota de sobrenadante que pueda haber quedado en los bordes.
- 9.11 Determine el número de cuentas de precipitado de cada tubo y de los tubos de cuentas totales, dejándolos en un contador de centelleo de rayos gamma durante el tiempo suficiente para lograr la precisión estadística (consulte la sección Limitaciones del procedimiento).

10. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO – OPCIÓN B

- 10.1 Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los reactivos congelados que hubiera. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 20-25° C. Mezcle con suavidad antes de usar.
- 10.2 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos de vidrio de 75 mm según el protocolo de la TABLA II.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

- 10.3** Agregue reactivos a los tubos como sigue:
- a. Tubos de cuentas totales**
Reservar aparte hasta el paso 5
 - b. Unión no específica (NSB)**
100 µL de calibrador 0
 - c. Calibrador 0**
100 µL de calibrador 0
200 µL de antisuero PTH C-terminal
 - d. Calibradores (1-6)**
100 µL de calibrador PTH
200 µL de antisuero PTH C-terminal
 - e. Controles y muestras desconocidas**
100 µL de suero
200 µL de antisuero PTH C-terminal
- 10.4** Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube a 2-8 °C durante 4 horas (±15 minutos).
- 10.5** Añada 200 µL de PTH ¹²⁵I a todos los tubos.
- 10.6** Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube a 2-8 °C durante 16-24 horas.
- 10.7** Añada 500 µL de complejo de precipitación a todos los tubos salvo a los de cuentas totales.
- 10.8** Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube durante dos horas (±15 minutos) a 2-8 °C.
- 10.9** Centrifugue los tubos usando un mínimo de 760 x g* durante 20 minutos a 2-8 °C o 20-25 °C.
- 10.10** Decante inmediatamente el sobrenadante de todos los tubos, salvo los de las cuentas totales, invirtiéndolos durante dos minutos como máximo. Antes de poner los tubos boca arriba, séquelos con papel secante para eliminar cualquier gota de sobrenadante que pueda haber quedado en los bordes.
- 10.11** Determine el número de cuentas de precipitado de cada tubo y de los tubos de cuentas totales, dejándolos en un contador de centelleo de rayos gamma durante el tiempo suficiente para lograr la precisión estadística (consulte la sección Limitaciones del procedimiento).

11. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- 11.1** Añada cada parte alícuota de reactivo al tercio inferior del tubo de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.
- 11.2** Los tubos desechables de vidrio de borosilicato de algunos fabricantes producen uniones no específicas elevadas.
- 11.3** Si prefiere aspirar el sobrenadante del precipitado, tenga cuidado para no alterar el pellet del precipitado.
- 11.4** Para asegurar completamente el resultado sólido de un RIA, deben comprobarse varios factores adicionales. DiaSorin recomienda comprobar los siguientes parámetros para asegurar el resultado uniforme del equipo:
- a. Cuentas totales**
 - b. Unión máxima**
Promedio de cuentas por minuto (CPM) de los tubos de calibrador 0/Promedio de cuentas por minuto (CPM) de los tubos de cuentas totales.
 - c. Unión no específica**
Promedio de CPM de los tubos NSB/Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

12. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos controles en cada ensayo para asegurar la validez de los resultados obtenidos. Debe determinarse una desviación media y estándar para cada control con un mínimo de diez ensayos. Entonces se puede obtener un rango aceptable de valores para estos controles usando desviaciones estándar de ± 2 de los valores previamente determinados. El laboratorio de control de calidad de DiaSorin ha determinado un rango para los controles incluidos en este equipo utilizando la Opción B. Estos rangos están impresos en los viales de control.

13. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibración que relacione el grado de unión con las concentraciones indicadas de los calibradores de la calibración. El gráfico puede tener una escala lineal o logarítmica. Cada uno de estos métodos indica básicamente los mismos valores para controles y muestras, aunque algunos ensayos pueden "ajustarse" mejor a un método determinado que a otro. El método de cálculo del laboratorio de control de calidad de DiaSorin es B/B_0 (%) frente a concentración logarítmica.

- 13.1 Calcule el promedio de CPM de cada calibrador, control y muestra desconocida.
- 13.2 Reste el promedio de CPM de los tubos NSB de todas las cuentas.
- 13.3 Divida las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra desconocida por las CPM corregidas del calibrador 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM de calibrador o muestra desconocida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

- 13.4 Con un papel gráfico semilogarítmico de 2 ciclos o log-logit, trace el B/B_0 porcentual de los calibradores PTH (eje vertical) frente a la concentración (eje horizontal).
- 13.5 Una los puntos con una línea de ajuste óptimo.
- 13.6 Interpole los niveles de PTH en las muestras a partir del trazado.
- 13.7 Si la lectura de cualquiera de las muestras desconocidas es mayor que el calibrador más alto, debe diluirse correctamente con calibrador 0 y volverse a someter al ensayo.
- 13.8 Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala para obtener el factor de dilución adecuado.
- 13.9 Calcule la unión máxima dividiendo las CPM del calibrador 0 por el promedio de cuentas totales obtenido con los tubos de cuentas totales.

DATOS DE REDUCCIÓN

El laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza un ajuste de curva spline suavizado.

TABLA III
 Datos de muestra de un ensayo RIA para PTH C-terminal de DiaSorin

Tubo	Duplicado CPM	Promedio CPM	CPM corregidas	Porcentaje unidas (B/T)	Porcentaje (B/B ₀)	Conc. (ng/mL)
Cuentas totales	15.724	15.731				
	15.738					
NSB	302	331		2,1		
	360					
Calibrador 0	7.262	7.193	6.862	45,7	100	
	7.124					
Calibradores (ng/mL)						
1 (0.32)	6.734	6.702	6.371		92,8	
		6.669				
2 (0.62)	6.358	6.392	6.061		88,3	
		6.425				
3 (1.44)	5.566	5.611	5.280		76,9	
	5.656					
4 (2.93)	4.139	4.105	3.774		55,0	
	4.074					
5 (6.03)	2.173	2.195	1.864		27,2	
		2.217				
6 (11.6)	753	749	418		6,1	
	745					
Muestras desconocidas						
1	4.463	4.493	4.162		60,7	2,48
	4.522					
2	6.382	6.424	6.093		88,8	0,64
	6.466					

La TABLA III y la FIGURA 1 incluyen ejemplos de muestra típicos y una curva de calibración para la Opción B; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular valores.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA MUESTRA DE PTH C-TERMINAL

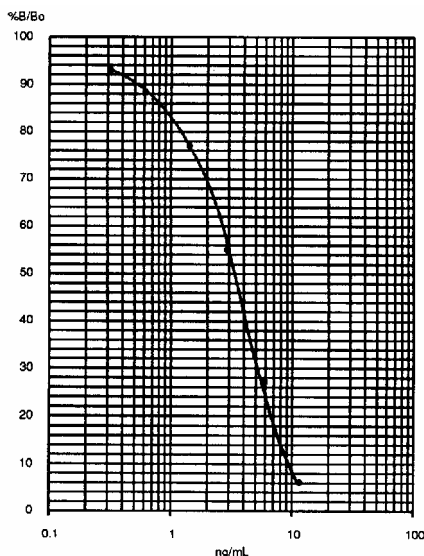


FIGURA 1

14. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 14.1 Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto, diluya sólo con calibrador 0.
- 14.2 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores estadísticos (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%; 10.000 CPM dará como resultado un 1% de error).
- 14.3. Estudios recientes han demostrado que si la incubación del segundo anticuerpo se efectúa a 2-8 °C en lugar de a 20-25 °C, el resultado es un incremento notable de la unión cero. Si el centrifugado se realiza a 20-25 °C, es necesario controlar la temperatura de forma que no exceda los 25 °C.

15. VALORES PREVISTOS

Rango normal

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. Los valores normales observados en el laboratorio de DiaSorin han sido $0,44 \pm 0,22$ ng/mL ($44,4 \pm 22,0$ pmol/L). Esto daría como resultado un rango normal (dos desv. est.) de valores no detectables (ND) - 0,88 ng/mL (ND - 88 pmol/L).

Interpretación de los valores clínicos

Los valores de los fragmentos PTH C-terminal del hiperparatiroidismo primario suelen estar por encima de los normales, si bien, como ocurre con todos los demás ensayos de PTH C-terminal, puede existir una superposición de valores patológicos con valores normales. Los sueros urémicos producirán valores enormemente elevados para PTH C-terminal.

LA TABLA IV muestra los datos de 16 pacientes con hiperparatiroidismo primario probado y 2 individuos paratiroidectomizados que toman vitamina D y calcio. En el 87% de estos casos, había una clara separación del rango normal, y los pacientes con hipoparatiroidismo se encontraban en el rango no detectable.

En el caso de la hipercalcemia de malignidad, la PTH C-terminal no suele mostrar valores elevados fuera del rango normal en comparación con el hiperparatiroidismo primario, aunque con niveles de calcio inferiores a 11,5 mg/dL, hay una superposición de estas dos enfermedades.

TABLA IV
Valores de PTH C-terminal en sueros de
adenomas paratiroides quirúrgicamente probados

Unidades
Calcio: mg/dL
PTH: ng/mL (equivalentes 1-84)

Adenoma paratiroideo					
Núm. muestra	Calcio	PTH	Núm. muestra	Calcio	PTH
1	12,4	2,6	9	12,4	5,9
2	10,7	2,1	10	11,0	2,0
3	11,2	1,3	11	11,3	2,2
4	10,9	3,0	12	10,8	0,8
5	11,3	3,8	13	11,2	2,0
6	13,0	3,4	14	10,8	2,4
7	11,1	1,9	15	11,0	2,9
8	12,2	1,0	16	12,8	2,8
			Desv. est. media	11,5	2,5
				0,78	1,2

Pacientes hipoparatiroides (tratados)

Núm. muestra	Calcio	PTH
1	8,4	<0,3
2	9,2	<0,3

15. RESULTADOS

15.1 Precisión

Variación intraensayo (valores = ng/mL)

	Valor medio	D.E.	(% CV)
BAJA	0,4	0,02	5,0
MEDIA	2,8	0,13	4,6
ALTA	5,6	0,28	5,0

Variación interensayo (valores = ng/mL)

	Valor medio	D.E.	(% CV)
BAJA	0,7	0,10	14,3
ALTA	5,1	0,41	8,0

15.2 Veracidad: la veracidad del ensayo se ha comprobado con la prueba de linealidad y la de recuperación.

Linealidad (paralelismo)

Estudio de dilución en serie de 4 muestras de pacientes (valores = ng/mL)

Núm. muestra	No diluida	1/2	1/4
1	5,6	5,4	5,2
2	7,3	6,8	6,8
3	10,0	1/4	1/8
4	>10	9,0	8,8
		10,8	10,4

Recuperación

Estudio de recuperación (valores = ng/mL)

Fondo	Calibrador agregado	Valor previsto	Valor medido	Porcentaje de recuperación
Conjunto nº 1	1,3	1,7	1,7	100
0,4	2,5	2,9	3,1	107
0,4	5,0	5,4	4,9	91
0,4				
Conjunto nº 2	1,3	1,6	1,7	106
0,3	2,5	2,8	2,7	96
0,3	5,0	5,3	5,3	100
0,3				
Conjunto nº 3	1,3	1,7	1,9	112
0,4	2,5	2,9	2,9	100
0,4	5,0	5,4	5,4	100
0,4				

15.3 Sensibilidad analítica

Cuando se define como la concentración evidente en tres desviaciones estándar de las cuentas con una unión máxima, la cantidad detectable mínima es de 0,01 ng/tubo (0,1 ng/mL) si la primera incubación es de 24 horas y de 0,02 ng/tubo (0,2 ng/mL) si la primera incubación es de 4 horas.

15.4 Especificidad analítica

La reactividad cruzada del anticuerpo PTH C-terminal se ha comparado con los siguientes péptidos a 1.000 veces el calibrador superior de PTH C-terminal:

Péptido	% de reactividad cruzada
bPTH	100
hPTH 65-84	100
hCalcitonina	<0,01
hProlactina	<0,01
hFSH	<0,01
hLH	<0,01
hTSH	<0,01
Tiroxina (T4)	<0,01

15.5 Interferencia

Se han realizado estudios de interferencia con NCCLS EP7-A como pauta para evaluar los efectos de las interferencias endógenas comunes. Los valores obtenidos demostraron interferencia debido a la adición de triglicéridos, colesterol y hemoglobina.

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

PROGRAMA DEL ENSAYO

Opción A

1. Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados que hubiera. No deje que los reactivos alcancen temperaturas superiores a 20-25 °C.
2. Identifique los tubos por duplicado.
3. Suministre los reactivos según el siguiente programa.

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	NSB	Cal 0-5	Controles y muestras desconocidas
Calibrador 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibradores (1-5)	-		100 µL	-
Controles	-	-	-	100 µL
Muestras desconocidas	-	-	-	100 µL
Antisuero			200 µL	200 µL

4. Mezcle bien e incube a 2-8 °C durante 16-24 horas.
5. Suministre 200 µL de trazador en todos los pocillos.
6. Mezcle bien e incube a 2-8 °C durante 16-24 horas.
7. Suministre 500 µL de complejo de precipitación en todos los pocillos, salvo los tubos de cuentas totales.
8. Mezcle bien e incube a 2-8 °C durante 2 horas (+/- 15 minutos).
9. Centrifugue durante 20 minutos con 760 x g*.
10. Decante los sobrenadantes.
11. Cuento cada tubo en un contador gamma durante 60 segundos o más.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

PROGRAMA DEL ENSAYO
Opción B

1. Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados que hubiera. No deje que los reactivos alcancen temperaturas superiores a 20-25 °C.
2. Identifique los tubos por duplicado.
3. Suministre los reactivos según el siguiente programa.

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	NSB	Cal 0-5	Controles y muestras desconocidas
Calibrador 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibradores (1-5)	-		100 µL	-
Controles	-	-	-	100 µL
Muestras desconocidas	-	-	-	100 µL
Antisuero			200 µL	200 µL

4. Mezcle bien e incube a 2-8 °C durante 4 horas (+/- 15 minutos).
5. Suministre 200 µL de trazador en todos los pocillos.
6. Mezcle bien e incube a 2-8 °C durante 16-24 horas.
7. Suministre 500 µL de complejo de precipitación en todos los pocillos, salvo los tubos de cuentas totales.
8. Mezcle bien e incube a 2-8 °C durante 2 horas (+/- 15 minutos).
9. Centrifugue durante 20 minutos con 760 x g*.
10. Decante los sobrenadantes.
11. Cunte cada tubo en un contador gamma durante 60 segundos o más.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA DI PTH C-TERMINALE

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Questo kit contiene istruzioni e materiali per la determinazione quantitativa dell'ormone paratiroideo umano C-terminale (hPTH) serico o plasmatico mediante analisi radioimmunologica (RIA).

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

L'ormone paratiroideo endogeno è un peptide/amminoacido che tende ad aumentare il calcio serico svolgendo un'azione specifica sui tessuti molli e sul metabolismo osseo. I peptidi paratiroidei vengono secreti da piccole ghiandole in risposta a una diminuzione del calcio serico. Generalmente, livelli elevati di calcio serico inibiscono la secrezione di PTH, eccetto nei tumori a secrezione di PTH. La concentrazione in circolo di PTH è relativamente bassa; sono pertanto necessarie tecniche radiometriche sensibili per misurare i livelli ematici di PTH.

Clinicamente, la misurazione di PTH si è dimostrata uno strumento estremamente utile ed efficace nella diagnosi differenziale e nel trattamento dell'iperparatiroidismo; nello specifico, la misurazione di PTH può aiutare la diagnosi effettuata dal medico di tumori e iperplasie delle ghiandole paratiroidee. Il rilevamento radioimmunologico di livelli ematici elevati di PTH spesso consente di stabilire che l'iperparatiroidismo è causato da una secrezione eccessiva di PTH.² Questo ormone consente inoltre di localizzare tessuti paratiroidei iperfunzionanti mediante analisi RIA di campioni ottenuti con cateterizzazione venosa.³ L'analisi radioimmunologica di PTH è infine utile nella diagnosi e nel trattamento dell'ipocalcemia. Salvo rare eccezioni, le persone ipocalcemiche con deficienza di PTH (ipoparatiroidismo) presentano concentrazioni subnormali di PTH.⁴ La misurazione del PTH serico è spesso usata per valutare lo stato di osteodistrofia renale in pazienti affetti da insufficienza renale in dialisi cronica.⁵ I livelli serici di PTH risultano spesso elevati in pazienti con insufficienza renale dovuta a bilancio negativo cronico di calcio, iperfosfatemia e ipocalcemia con successivo iperparatiroidismo secondario.

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi RIA C-terminale DiaSorin è una procedura di disequilibrio che prevede l'aggiunta ritardata di tracciante per aumentare la sensibilità. L'anticorpo è stato prodotto utilizzando PTH bovino intatto e reagisce alla sequenza 65-84 del PTH umano. L'anticorpo presenta una costante di affinità di 1×10^{10} L/mole. Nell'analisi RIA, il campione e il primo anticorpo vengono combinati e incubati per 16-24 ore (Opzione A) o 4 ore (Opzione B) a 2-8°C. Dopo la successiva aggiunta di tracciante, ha luogo una seconda incubazione di 16-24 ore a 2-8°C. La separazione è ottenuta con un doppio anticorpo pre-precipitato accelerato con PEG. L'anticorpo pre-precipitato viene aggiunto come singolo reagente con un successivo periodo di incubazione di due ore. I calibratori sono espressi in funzione della massa di PTH umano 1-84 in ng/mL.

Il controllo qualità sarà effettuato da DiaSorin utilizzando soltanto l'Opzione B.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratore 0 di PTH C-terminale	1 fiala/20 mL	1 fiala/20 mL
Calibratori 1-6 di PTH C-terminale	6 fiale/1,0 mL	6 fiale/1,0 mL
Antisiero PTH C-terminale ¹²⁵ I	1 fiala/14 mL	2 fiale/14 mL
Tracciante di PTH C-terminale	1 fiala/14 mL	2 fiale/14 mL
Controlli di PTH C-terminale	2 fiale/ 1,0 mL	2 fiale/ 1,0 mL
Complesso precipitante di PTH C-terminale	1 fiala/ 35 mL	2 fiale/ 35 mL
Numero di test	65	130

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, conservare tutti i reagenti a -15°C o a una temperatura inferiore, fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 Calibratore 0 di PTH C-terminale: reagente liofilizzato

Nel tampone BSA-borato si aggiungono sodio azide (0,2%) e altri stabilizzanti. Ricostituire la fiala con 20 mL di acqua purificata e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.2 Calibratori di hPTH C-terminale (1-6): reagente liofilizzato

Calibratori 65-84 hPTH sintetici, a concentrazioni nominali da 0,312 a 10 ng/mL (31,2-1000 pmol/L) sono prediluiti in un calibratore 0 contenente sodio azide (0,1%) e altri stabilizzanti. I valori esatti della concentrazione sono assegnati per ogni lotto. Ricostituire la fiala con 1,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso. Il calibratore 65-84 hPTH sintetico DiaSorin è stato calibrato rispetto a una preparazione 79/500 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (W.H.O.) Eventuali comparazioni con altri prodotti o procedure devono essere eseguite in base alle norme di questo standard di riferimento. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente se usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, secondo le raccomandazioni pertinenti.

4.3 Antisiero PTH C-terminale: reagente liofilizzato

L'anticorpo ormone paratiroideo anti-umano di pollo è diluito in un tampone BSA-borato contenente sodio azide. Ricostituire la fiala con 14 mL di acqua purificata e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.4 ¹²⁵I PTH C-terminale: reagente liofilizzato

Il PTH C-terminale umano sintetico è etichettato con iodio-125 e diluito in un tampone BSA-borato-EDTA contenente sodio azide (0,4%). Ricostituire la fiala con 14 mL di acqua purificata e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente prima dell'uso.

4.5 Complesso precipitante di PTH C-terminale: reagente liofilizzato

Il siero normale di pollo, pre-precipitato con siero di coniglio o capra anti-pollo e polietilene glicolico (PEG), è diluito in un tampone BSA-borato contenente sodio azide (0,3%). Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua purificata; mescolare accuratamente fino a quando la sospensione non appare omogenea e lasciare riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente, mescolando di tanto in tanto.

4.6 Controlli di PTH C-terminale, Livello 1 e 2: reagente liofilizzato

Nel siero umano si aggiungono le quantità necessarie di hPTH sintetico 65-84 per ottenere una concentrazione nel range specificato. Si aggiungono sodio azide (0,1%) e altri stabilizzanti. Ricostituire la fiala con 1,0 mL di acqua purificata, mescolare e lasciare riposare per 15-20 minuti fino a quando il contenuto è completamente disciolto; mescolare accuratamente e trattare come campione non noto.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI ORIGINE UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg e anticorpi ad HIV. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B, del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nel manuale dei Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua per evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo delle malattie di Atlanta, GA, U.S.A. 1976.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

I kit contengono materiale radioattivo non superiore a 1,5 μCi (55,5 kBq) di iodio-125 per il kit N. 13065 o a 3 μCi (111 kBq) di iodio-125 per il kit N. 13130. Adottare precauzioni adeguate e buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test *in vitro* clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.

5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività indicata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indica la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

- 6.1 La presenza di particolato in uno qualsiasi dei reagenti.
- 6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibratore rispetto a quella ottenuta di norma.
- 6.3 Una diminuzione del legame massimo.
- 6.4 Un legame altamente aspecifico.

7. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL SIERO E DEL PLASMA

Sono richiesti cento (100) microlitri di siero o plasma EDTA, in due serie, da usare per l'analisi di PTH C-terminale.

Per ottenere il siero, raccogliere il sangue mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente (15-25°C). Per ottenere il plasma, raccogliere il sangue mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. L'EDTA (7,2 mg/5 mL di sangue) è usato come anticoagulante. Centrifugare per 15 minuti usando circa 760 x g* per ottenere sieri privi di emolisi. Non sono richiesti additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione. Si consigliano campioni prelevati a digiuno, anche se non obbligatorio.

Per risultati ottimali, i campioni di siero o plasma devono essere conservati congelati. Studi indicano che i campioni di PTH C-terminale rimangono stabili per almeno 3-6 mesi a -20°C. I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 8.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.
- 8.2 Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm.
- 8.3 Contatore a emissione di scintille gamma adatto per il conteggio di iodio ¹²⁵I.
- 8.4 Vortex.
- 8.5 Dispositivi per operazioni con pipetta:
 - a. Micropipette calibrate per erogare 100 µL, 200 µL, and 500 µL.
 - b. Dosatori a ripetizione calibrati per erogare 200 µL e 500 µL.
- 8.6 Acqua purificata.

9. PROCEDURA DI ANALISI - OPZIONE A

- 9.1 Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciare scongelare completamente eventuali reagenti congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 20-25°C. Agitare delicatamente prima dell'uso.
- 9.2 Preparare due serie di 12 provette di vetro da 75 mm etichettate secondo lo Schema di analisi sul retro.

- 9.3** Aggiungere i reagenti nelle provette come indicato di seguito:
- a. Provette per il conteggio totale**
Lasciare da parte fino al punto 5
 - b. Legame aspecifico (NSB)**
100 µL di calibratore 0
 - c. Calibratore 0**
100 µL di calibratore 0
200 µL di antisiero di PTH C-terminale
 - d. Calibratori (1-6)**
100 µL di calibratore PTH
200 µL di antisiero di PTH C-terminale
 - e. Controlli e campioni non noti**
100 µL di siero
200 µL di antisiero di PTH C-terminale
- 9.4** Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
- 9.5** Aggiungere 200 µL di ¹²⁵I PTH a tutte le provette.
- 9.6** Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
- 9.7** Aggiungere 500 µL di complesso precipitante in tutte le provette, eccetto quelle per il conteggio totale.
- 9.8** Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per due ore (+/- 15 minuti) a 2-8°C.
- 9.9** Centrifugare le provette utilizzando almeno 760 x g* per 20 minuti a 2-8°C o 20-25°C.
- 9.10** Lasciare immediatamente decantare i liquidi superficiali in tutte le provette, eccetto quelle per il conteggio totale, capovolgendole per un massimo di due minuti. Asciugare le provette con carta assorbente per eliminare eventuali gocce di liquidi superficiali prima di riportare le provette in posizione verticale.
- 9.11** In un contatore a emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e le provette per il conteggio totale per un tempo sufficiente a raggiungere la precisione statistica (vedere la sezione Limiti della procedura).
- 10. PROCEDURA DI ANALISI - Opzione B**
- 10.1** Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali reagenti congelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 20-25°C. Mescolare accuratamente prima dell'uso.
- 10.2** Preparare due serie di 12 provette in vetro da 75 mm in base al protocollo riportato nella TABELLA II.
- 10.3** Aggiungere i reagenti nelle provette come indicato di seguito:
- a. Provette per il conteggio totale**
Lasciare da parte fino al punto 5
 - b. Legame aspecifico (NSB)**
100 µL di calibratore 0
 - c. Calibratore 0**
100 µL di calibratore 0
200 µL di antisiero di PTH C-terminale

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

- d. **Calibratori (1-6)**
100 µL di calibratore PTH
200 µL di antisiero di PTH C-terminale
 - e. **Controlli e campioni non noti**
100 µL di siero
200 µL di antisiero di PTH C-terminale
 - 10.4 Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 4 ore (+/- 15 minuti) a 2-8°C.
 - 10.5 Aggiungere 200 µL di ¹²⁵I PTH in tutte le provette.
 - 10.6 Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
 - 10.7 Aggiungere 500 µL di complesso precipitante in tutte le provette, eccetto quelle per il conteggio totale.
 - 10.8 Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per due ore (±15 minuti) a 2-8°C.
 - 10.9 Centrifugare le provette utilizzando almeno 760 x g* per 20 minuti a 2-8°C o 20-25°C.
 - 10.10 Lasciare immediatamente decantare i liquidi superficiali in tutte le provette, eccetto quelle per il conteggio totale, capovolgendole per un massimo di due minuti. Asciugare le provette con carta assorbente per eliminare eventuali gocce di liquidi superficiali prima di riportare le provette in posizione verticale.
 - 10.11 In un contatore a emissione di scintille gamma, contare il precipitato di ogni provetta e le provette per il conteggio totale per un tempo sufficiente a raggiungere la precisione statistica (vedere la sezione Limiti della procedura).
- 11. COMMENTI SULLA PROCEDURA**
- 11.1 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.
 - 11.2 Alcune provette monouso determinano legami aspecifici elevati.
 - 11.3 Se si decide di aspirare il liquido superficiale dal precipitato, fare attenzione a non smuovere quest'ultimo.
 - 11.4 Per un monitoraggio completo della costanza di performance di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit:
 - a. **Conteggi totali**
 - b. **Legame massimo**
Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0 /CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - c. **Legame non specifico**
CPM medio delle provette NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.

12. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due campioni di controllo di ogni analisi per garantire la validità dei risultati. Determinare quindi la deviazione media e standard per ogni controllo usando un minimo di dieci analisi. Si può ottenere un range accettabile di valori per questi controlli utilizzando ±2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di controllo qualità DiaSorin ha stabilito un range per i controlli inclusi nel kit utilizzando l'Opzione B. Tali range sono stampati sulle fiale di controllo.

* $g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$

13. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di analisi RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori per la calibrazione. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B₀ rispetto alla concentrazione di log.

- 13.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.
- 13.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.
- 13.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione non noto per il CPM corretto del calibratore 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto} - \text{CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0} - \text{CPM di NSB}} \times 100$$

- 13.4 Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica, tracciare la percentuale di B/B₀ per i calibratori di PTH (asse verticale) rispetto alla concentrazione (asse orizzontale).
- 13.5 Tracciare una linea di migliore interpolazione fra i punti.
- 13.6 Interpolare i livelli di PTH nei campioni dal tracciato.
- 13.7 Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito correttamente con il calibratore 0 e analizzato nuovamente.
- 13.8 Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.
- 13.9 Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.

Riduzione dei dati

Il Laboratorio di controllo qualità DiaSorin QC utilizza una retta curvilinea uniforme.

TABELLA III
Dati campione RIA PTH C-terminale DiaSorin

Provetta	Duplicato CPM	Medio CPM	Corretto CPM	% Legame (B/T)	Percent. (B/B ₀)	Conc. (ng/mL)
Conteggio totale	15,724 15,738	15,731				
NSB	302 360	331		2,1		
Calibratore 0	7,262 7,124	7,193	6,862	45,7	100	
Calibratori (ng/mL)						
1 (0.32)	6,734	6,702 6,669	6,371		92,8	
2 (0.62)	6,358	6,392 6,425	6,061		88,3	
3 (1.44)	5,566 5,656	5,611	5,280		76,9	
4 (2.93)	4,139 4,074	4,105	3,774		55,0	
5 (6.03)	2,173	2,195 2,217	1,864		27,2	
6 (11.6)	753 745	749	418		6,1	
Campioni non noti						
1	4,463 4,522	4,493	4,162		60,7	2,48
2	6,382 6,466	6,424	6,093		88,8	0,64

I dati di campioni tipici e una curva di calibratore per l'Opzione B sono riportati nella TABELLA III E FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

CURVA CALIBRATORE CAMPIONE DI PTH C-TERMINALE

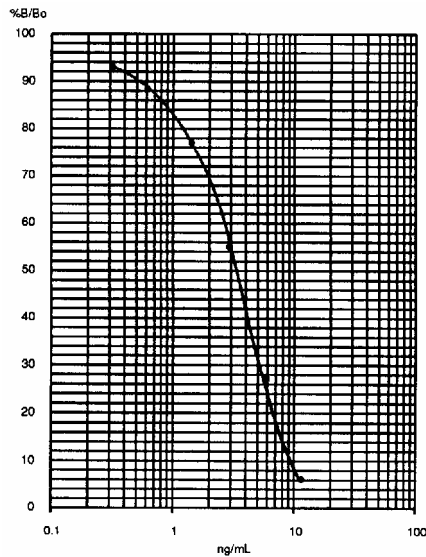


FIGURA 1

14. LIMITI DELLA PROCEDURA

- 14.1 Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del calibratore superiore, diluire solo con il calibratore 0.
- 14.2 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrranno un errore dell'1%).
- 14.3. Studi recenti hanno dimostrato che se la seconda incubazione dell'anticorpo viene eseguita a 2-8°C invece di 20-25°C, si verifica un aumento significativo del legame zero. Se si esegue la centrifugazione a 20-25°C, è necessario controllare che la temperatura non superi 25°C.

15. VALORI PREVISTI

Range normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio. I valori normali osservati nei laboratori DiaSorin sono risultati pari a $0,44 \pm 0,22$ ng/mL ($44,4 \pm 22,0$ pmol/L). Tali valori determinerebbero un range normale (due deviazioni standard) di (ND) non rilevabile pari a 0,88 ng/mL (ND - 88 pmol/L).

Interpretazione dei valori clinici

I valori dei segmenti di PTH C-terminale nell'iperparatiroidismo primario sono generalmente superiori alla norma nonostante la possibile sovrapposizione, come in tutte le altre analisi di PTH C-terminale, dei valori patologici con i valori normali. I sieri uremici producono valori estremamente elevati di PTH C-terminale.

NELLA TABELLA IV sono riportati i dati relativi a 16 pazienti affetti da iperparatiroidismo primario e due individui sottoposti a paratiroidectomia in trattamento con vitamina D e calcio. Nell'87% dei casi sopra menzionati, è stata evidenziato un netto scostamento dai valori normali, mentre i pazienti affetti da ipoparatiroidismo sono risultati nel range non rilevabile.

Nell'ipercalcemia maligna, il PTH C-terminale non si scosta generalmente dal range normale, a differenza dell'iperparatiroidismo primario, sebbene si verifichi, in presenza di livelli di calcio inferiori a 11,5 mg/dL, una sovrapposizione di questi due stati patologici.

TABELLA IV

Valori serici di PTH C-terminale da adenomi paratiroidi rilevati chirurgicamente

Unità

Calcio: mg/dL

PTH: ng/mL (1-84 equivalenti)

Adenoma paratiroideo

N. campione	Calcio	PTH	N. campione	Calcio	PTH
1	12,4	2,6	9	12,4	5,9
2	10,7	2,1	10	11,0	2,0
3	11,2	1,3	11	11,3	2,2
4	10,9	3,0	12	10,8	0,8
5	11,3	3,8	13	11,2	2,0
6	13,0	3,4	14	10,8	2,4
7	11,1	1,9	15	11,0	2,9
8	12,2	1,0	16	12,8	2,8
			Media	11,5	2,5
			Dev. standard	0,78	1,2

Ipoparatiroidismo (trattato)

N. campione	Calcio	PTH
1	8,4	<0,3
2	9,2	<0,3

15. DATI DI PERFORMANCE

15.1 Precisione

Variazione intra-analisi (valori = ng/mL)

	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
BASSO	0,4	0,02	5,0
MEDIO	2,8	0,13	4,6
ALTO	5,6	0,28	5,0

Variazione inter-analisi (valori = ng/mL)

	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
BASSO	0,7	0,10	14,3
MEDIO	5,1	0,41	8,0

15.2 Affidabilità: L'AFFIDABILITÀ DELL'ANALISI È STATA VERIFICATA MEDIANTE TEST DI LINEARITÀ E DI RECUPERO.

Linearità (Parallelismo)

Studio di diluizione seriale di 4 campioni (valori = ng/mL)

N. campione	N. campione	1/2	1/4
1	5,6	5,4	5,2
2	7,3	6,8	6,8
3	10,0	1/4	1/8
4	>10	9,0	8,8
		10,8	10,4

Recupero

Studio del recupero (valori = ng/mL)

Valore di fondo	Calibratore aggiunto	Valore previsto	Valore misurato	Percentuale di recupero
Set N. 1				
0,4	1,3	1,7	1,7	100
0,4	2,5	2,9	3,1	107
0,4	5,0	5,4	4,9	91
Set N. 2				
0,3	1,3	1,6	1,7	106
0,3	2,5	2,8	2,7	96
0,3	5,0	5,3	5,3	100
Set N. 3				
0,4	1,3	1,7	1,9	112
0,4	2,5	2,9	2,9	100
0,4	5,0	5,4	5,4	100

15.3 Sensibilità analitica

La quantità minima rilevabile, se definita come concentrazione apparente a tre deviazioni standard dai conteggi a legame massimo, è pari a 0,01 ng/provetta (0,1 ng/mL) con la prima incubazione di 24 ore e a 0,02 ng/provetta (0,2 ng/mL) con la prima incubazione di 4 ore.

15.4 Specificità analitica

Il confronto della reattività incrociata dell'anticorpo PTH C-terminale è stato eseguito con i seguenti peptidi a 1.000 volte il calibratore superiore per PTH C-terminale:

Peptide	% di reattività incrociata
bPTH	100
hPTH 65-84	100
hCalcitonina	<0,01
hProlattina	<0,01
hFSH	<0,01
hLH	<0,01
hTSH	<0,01
Tirossina (T4)	<0,01

15.5 Interferenza

Studi di interferenza sono stati eseguiti in base alla linea guida NCCLS EP7-A per valutare gli effetti degli agenti interferenti endogeni comuni. I valori ottenuti hanno dimostrato un'interferenza dovuta all'aggiunta di trigliceridi, colesterolo ed emoglobina.

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

SCHEMA DI ANALISI

Opzione A

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciare scongelare completamente eventuali campioni surgelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 20-25°C.
2. Contrassegnare due serie di provette.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	NSB	Cal. 0-5	Controlli e campioni non noti
Calibratore 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibratori (1-5)	-	-	100 µL	-
Controlli	-	-	-	100 µL
Campioni non noti	-	-	-	100 µL
Antisiero	-	-	200 µL	200 µL

4. Mescolare bene e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
5. Versare 200 µL di tracciante in tutti i recipienti.
6. Mescolare bene e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
7. Versare 500 µL di complesso precipitante in tutti i recipienti, eccetto le provette per il conteggio totale.
8. Mescolare bene e lasciare in incubazione per 2 ore (+/- 15 minuti) a 2-8°C.
9. Centrifugare per 20 minuti utilizzando 760 x g*.
10. Fare decantare i liquidi superficiali.
11. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

SCHEMA DI ANALISI
Opzione B

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni surgelati. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 20-25°C.
2. Contrassegnare due serie di provette.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	NSB	Cal. 0-5	Controlli e campioni non noti
Calibratore 0	-	100 µL	100 µL	-
Calibratori (1-5)	-		100 µL	-
Controlli	-	-	-	100 µL
Campioni non noti	-	-	-	100 µL
Antisiero			200 µL	200 µL







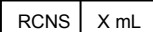


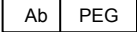
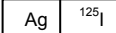




4. Mescolare bene e lasciare in incubazione per 4 ore (+/- 15 minuti) a 2-8°C.
5. Versare 200 µL di tracciante in tutti i recipienti.
6. Mescolare bene e lasciare in incubazione per 16-24 ore a 2-8°C.
7. Versare 500 µL di complesso precipitante in tutti i recipienti, eccetto le provette per il conteggio totale.
8. Mescolare bene e lasciare in incubazione per 2 ore (+/- 15 minuti) a 2-8°C.
9. Centrifugare per 20 minuti utilizzando 760 x g*.
10. Fare decantare i liquidi superficiali.
11. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

*g = $(1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$

REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA

1. Roos, B.A., A.W. Lindall, D.C. Aron, J.W. Orf, M. Yoon, M.B. Huber, J. Pensky, J. Ells and P.W. Lambert, "Detection and Characterization of Small Mid-region Parathyroid Hormone Fragment(s) in Normal and Hyperparathyroid Glands and Sera by Immuno-extraction and Region-specific Radioimmunoassay," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 53:709, (1981).
2. Lindall, A.W., B.A. Roos and M. Cecchetti, "Potential Clinical Usefulness of New Glandular and Circulating Parathyroid Peptides Illuminated by Sequence Specific Radioimmunoassay," Presented at the 3rd International Symposium on Calcitropic Hormones Methods and Clinical Applications at Gardone, Italy, April 1981, published in *Monoclonal Antibodies and Developments in Immunoassay*, 217-229, A. Albertini and R. Ekins, eds., **Elsevier/North-Holland Biomedical Press**, (1981).
3. Lindall, A.W. and E.T. Wong, "Localization of Substernal Parathyroid Adenomas," **Minnesota Medicine**, 57:87, (1974).
4. Mallette, L.E., S.N. Tuma, R.E. Berger and J.L. Kirkland, "Radioimmunoassay for the Middle Region of Human Parathyroid Hormone Using an Homologous Antiserum with a Carboxy-terminal Fragment of Bovine Parathyroid Hormone as Radioligand," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 54:1017, (1982).
5. Lindall, A.W., J. Ells, J. Elting and B. Roos, "Estimation of Biologically Active Intact Parathyroid Hormone in Normal and Hyperparathyroid Sera by Sequential N-terminal Immunoextraction and Mid-region Radioimmunoassay," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 57:1007, (1983).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Español	Italiano
	European Conformity	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	<i>In vitro</i> diagnostic.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
	Maximum Temperature	Temperatura máxima	Temperatura massima
	Reconstitute with X mL	Reconstitución con X mL	Ricostituire con X mL
	Lot No.	Número de lote	Lotto n°
	Antiserum	Antisuero	Antisiero
	Precipitating reagent	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
	Tracer: antigen labelled with ¹²⁵ I	Trazador: antígeno etiquetado con ¹²⁵ I	Tracciatore: antigene etichettato con ¹²⁵ I
	Calibrator	Calibrador	Calibratore
	Control serum	Suero de control	Siero di controllo
	Radioactive	Radioactivo	Radioattivo
	Harmful	Nocivo	Nocivo



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

For Customer Service in the U.S. and Canada Call Toll Free: 800-328-1482	
In the United Kingdom Call: 44 118 9364200 FAX: 44 118 9792061	
10391	27830 1/04

PRINTED IN U.S.A.

