



EIASON[®] hPTH



Immunozymetrisches Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem intaktem Parathormon (PTH) in Serum und Plasma

Anleitung

Nur für in-vitro Gebrauch

Produkt von



IASON GmbH

Feldkirchner Straße 4

A – 8054 Graz-Seiersberg

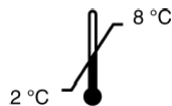
Tel.: +43 (0)316 28 43 00

Fax: +43 (0)316 28 43 00-113







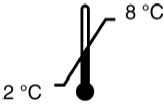


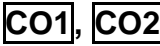






Email: order@iason.eu

www.iason.eu

REF E04-055-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Konjugat
	Bestellnummer		Mikrotiterplatte
	Hergestellt von		Waschlösung
	Lagerung bei		Kalibratoren
	Mikrotiterplatte		Kontrollseren
	Europäische Konformität		Substrat
	Verwendbar bis		Stopplösung
	Chargenbezeichnung		Inkubationsbuffer

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Der EIASON® hPTH Kit ist ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem intaktem Parathormon (PTH) in Serum und Plasma.

Zusammenfassung

Biologische Aktivitäten

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

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

Klinische Anwendung

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

Messprinzip

Der EIASON® hPTH Kit ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem eingefangenen polyklonalen Antikörper (PAb, Ziege-anti 1-34 PTH-Fragment), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind. Nach einer Inkubationsphase werden überflüssige Antigene durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend werden monoklonale Antikörper (MAb, Maus-anti 44-68 PTH-Fragment), gekennzeichnet mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), hinzugegeben. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: PAb – Human PTH - MAb - HRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird

kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur PTH-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die PTH-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung eines Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® hPTH Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden, (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist), haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei.

Unser Produzent prüft humanes Rohmaterial, dass in diesem Kit zum Einsatz kommt, auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis, sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma IASON GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde.

Aufbewahrung und Lagerung der Reagenzien

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden bis zum Verfallsdatum.
- Nach der Rekonstitution müssen alle **CAL**, **CO** und Inkubationsserum sofort nach Verwendung eingefroren werden und können bei -20 °C drei Monate lang aufbewahrt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte **WASH** ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das **CONJ** bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

Probensammlung und Probenvorbereitung

- Blutproben müssen unverzüglich von den Blutzellen getrennt werden.
- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 8 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20 °C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Es wird empfohlen, den Assay mit Serumproben durchzuführen.
- Keine hämolytischen Proben benutzen

Kitbestandteile

1. **MPL Mikrotiterplatte** mit 96 anti PTH- beschichteten abbrechbaren Wells, (polyklonale Antikörper), 96 Wells, gebrauchsfertig.
2. **CAL0 Null Kalibrator** in Humanplasma und Thymol, 1 Gefäß, lyophilisiert, 3,0 mL dest. Wasser zugeben.
3. **CAL1-CAL5 Kalibratoren**, (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten), in Humanplasma und Thymol, 5 Gefäße, lyophilisiert, 1,0 mL dest. Wasser zugeben
4. **CO1, CO2 Kontrollen**, Humanplasma und Thymol, 2 Gefäße, lyophilisiert, 1,0 mL dest. Wasser zugeben.
5. **WASH Waschlösung**, Konzentrat (NaCl-Tween 20), 1 Gefäß, 25 mL, 28 x mit dest. Wasser verdünnen. Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil **WASH** (28 x) mit 27 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.
6. **CONJ Konjugat**, HRP markierte anti-PTH (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, Thymol und Schafserum, 1 Gefäß, 11 mL, gebrauchsfertig.
7. **INCBU Inkubationspuffer** mit EDTA, Benzamidin und Azid (< 0,1%), 1 Gefäß, 6 mL, gebrauchsfertig.
8. **SUB Chromogenes TMB** (Tetramethylbenzidin), 1 Gefäß, 25 mL, gebrauchsfertig.
9. **STOP Stopplösung**, HCl 1N, 1 Gefäß, 25 mL, gebrauchsfertig.

Bemerkung:

1. Benutzen Sie den **CAL0** zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu zu 1 pg eines synthetischen PTH (1-84) vom Japanese Peptide Institute.

Erforderliches Zubehör

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten: 50 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 2 mL und 3 mL (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Vortex Mixer

- Magnetrührer
- Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm ± 100 rpm
- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (monochromatische Auswertung)

Testdurchführung

Allgemeine Informationen

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie **CAL**, **CO** und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der **WASH** einen reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung von **SUB** und **STOP** keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung eines Drifts dürfen zwischen der Pipettierung des ersten **CAL** und der letzten Probe nicht mehr als 60 Minuten verstreichen.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie **SUB** innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit **SUB** ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

Testdurchführung

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie 50 µL **INCBU** in alle Wells.
4. Pipettieren Sie jeweils 200 µL **CAL**, **CO** und Probe in die entsprechenden Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab. Waschen Sie die Platte viermal: Pipettieren Sie 0,4 mL verdünnter **WASH** in jedes Well; saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab.
7. Pipettieren Sie jeweils 100 µL **CONJ** in die entsprechenden Wells.

8. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm \pm 100 rpm.
9. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab. Waschen Sie die Platte viermal: Pipettieren Sie 0,4 mL verdünnter **WASH** in jedes Well; saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab.
10. Pipettieren Sie 100 μ L **SUB** innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jedes Well.
11. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem horizontalem Schüttler bei 700 rpm \pm 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
12. Pipettieren Sie 200 μ L **STOP** in jedes Well.
13. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate

oder vollautomatisch auf:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Quardette**
- **IASON® Gladiator**

Ergebnisberechnung

Polychromatische Auswertung:

In diesem Fall werden die Daten durch die Software verarbeitet.

1. Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
2. Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
3. Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
4. Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:

X_i = OD bei 450 nm

Y_i = OD bei 490 nm

Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet:

$$Y = A \cdot X - B$$

Wenn $X_i < 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = X_i

Wenn $X_i > 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B) / A$

Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt. Die PTH Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

Bichromatische Auswertung:

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.

3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier die optische Dichte (OD) (Ordinate) für jeden Kalibrator gegen die entsprechende PTH Konzentration (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

Assay Beispieldaten

Typische Ergebnisse der EIASON® hPTH Standards

EIASON® hPTH		OD (Polychromatisches Model)
CAL	0,0 pg/mL	0,050
	22 pg/mL	0,149
	70 pg/mL	0,344
	224 pg/mL	0,999
	666 pg/mL	2,721
	1400 pg/mL	4,483

Diese Daten dienen nur zur Illustration und sind nicht für die Berechnung der Probenergebnisse zu verwenden.

Erwartete Werte

	pg/mL
Gesunde Patienten	16 – 46
Hyperparathyreodismus	106 - > 1000
Hypoparathyreodismus	0 – 6,4

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln. Bereich ist auf Basis der 5% und 95% Perzentile.

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Test Charakteristika

Nachweisgrenze

Zwanzig **CAL0** wurden zusammen mit einem Satz anderer **CAL** gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entspricht 2 pg/mL.

Spezifität

Kreuzreaktive Hormone oder Fragmente wurden dem **CAL0**, einem **CAL** mit hohem Wert (900 pg/mL) und einem **CAL** mit niedrigem Wert (100 pg/mL) zugesetzt. Die auftretende PTH-Reaktion wurde gemessen.

Kreuzreaktant	Keine signifikante Interferenz bis
PTH 1-34 humanes synthetisches Fragment	1000 pg/mL
PTH 44-68 humanes synthetisches Fragment	20000 pg/mL
PTH 53-84 humanes synthetisches Fragment	20000 pg/mL
PTH 73-84 humanes synthetisches Fragment	100000 pg/mL
PTH-ähnliches Protein 1-34 humanes synthetisches Fragment	100000 pg/mL

Präzision

Intra-Assay Präzision				Inter-Assay Präzision			
Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)
A	10	41,0 ± 0,5	1,1	A	20	45,7 ± 3,3	7,1
B	10	594 ± 12	2,0	B	20	381 ± 11,1	2,9

Genauigkeit*Wiederfindungstest*

Probe	Zuggeg. PTH (pg/mL)	Wiedergef. PTH (pg/mL)	Wiedergefunden (%)
Serum	371	333	90
Heparin Plasma	371	347	93
EDTA Plasma	371	350	94

Verdünnungstest

Probe	Verdünnung	Theoret. Konz. (pg/mL)	Gemessene Konz. (pg/mL)
Serum	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

Proben wurden mit **CAL0** verdünnt.

Zeitverzögerung zwischen letzter **CAL- und Probenzugabe**

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 60 Minuten nach Zugabe des **CAL** in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

	0'	15'	30'	45'	60'
CAL1	158	146	166	144	137
CAL2	77	72	70	67	72
CAL3	328	320	323	342	357
CAL4	260	250	250	258	251

Rechtliche Grundlagen**Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

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

Arbeitsschema

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. Pipettieren	INCBU	50µL	
2. Pipettieren	CAL0 – CAL5 200µL	CO1, CO2 200µL	Proben 200µL
3. Inkubation	2 Stunden bei Raumtemperatur (18 – 25°C) auf einem Schüttler (700 rpm)		
4. Waschen	Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 400 µL WASH pipettieren Vorgang 3 mal wiederholen auf Zellstoff abtropfen		
5. Pipettieren	CONJ	100µL	
6. Inkubation	1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler (700 rpm)		
7. Waschen	Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 400 µL WASH pipettieren Vorgang 3 mal wiederholen auf Zellstoff abtropfen		
8. Pipettieren	SUB	100µL	
9. Inkubation	30 min bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler (700 rpm)		
10. Pipettieren	STOP	200µL	
11. Messen	450nm (RF 630/650nm) und/oder 490 (RF 630/650nm) Berechnung: 4-Parameter or Point To Point		

Erwartete Werte

	pg/mL
Gesunde Patienten	16 – 46
Hyperparathyreodismus	106 - > 1000
Hypoparathyreodismus	0 – 6,4



EIASON® hPTH



Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of intact human Parathyroid Hormone (PTH) in serum and plasma

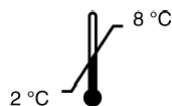
Instruction for Use

For in-vitro use only







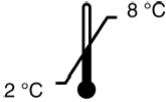
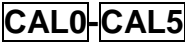

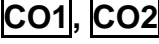






Product of



IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
e-mail: order@iason.eu
www.iason.eu



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Conjugate
	Order number		Microtiterplate
	Product of		Wash solution
	Storage		Calibrators
	European Conformity		Control sera
	Expiry date		Substrate
	Batch code		Stop solution
	Microplate		Incubation Buffer

Intended use

For in-vitro use only.

The EIASON® hPTH kit is an immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of intact human Parathyroid Hormone (PTH) in serum and plasma.

Summary

Biological Activity

Human parathyroid hormone (hPTH) is a major physiological regulator of phosphocalcic metabolism. hPTH increases serum calcium concentrations by its actions on kidney (enhancing tubular Ca^{++} reabsorption and phosphate excretion) and bone (stimulating osteoclastic activity and bone resorption). It indirectly affects intestinal absorption of Ca^{++} by stimulating renal 1α -hydroxylation of 25 hydroxyvitamin D. The release of PTH is controlled in a negative feedback loop by the serum concentration of Ca^{++} . PTH is synthesized in the chief cells of the parathyroid glands and secreted as an 84 amino acid molecule called "intact PTH", which is the main bioactive product. This molecule is degraded by proteolytic cleavage between amino acids 33-37 at peripheral sites to form biologically active aminoterminal fragments and biologically inactive carboxyl-terminal fragments. The carboxylterminal fragments are cleared only by glomerular filtration, while the bioactive intact PTH and amino-terminal fragments are also metabolically degraded in the liver and other tissues. The half-life of the carboxylterminal fragments increases dramatically in patients with renal failure. Thus, the measurement of intact PTH correlates best with the hormone production and biological activity.

Clinical application

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

Assay principle

The EIASON® hPTH kit is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplates. Calibrators and samples react with the capture polyclonal antibodies (PAb, goat anti 1-34 PTH fragment) coated on microtiter well. After incubation, the excess of antigen is removed by washing. Then monoclonal antibodies (MAb, mouse anti 44-68 PTH fragment) labelled with horseradish peroxidase (HRP) are added. After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated PAb – human PTH – MAb – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. The chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the PTH concentration.

A calibration curve is plotted and PTH concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the EASIA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

Warnings and precautions

The EIASON® hPTH kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Damaged test kit

In case of serious damage to the test kit or components, the company IASON must be notified in writing at least one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for the test run. They have to be stored until a final solution has been found.

Shelf life and storage of reagents

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, **CAL** and **CO** should be frozen immediately after use and kept at -20°C for three months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- The concentrated **WASH** is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared working wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the **CONJ** is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

Specimen collection and preparation

- Blood samples should be promptly separated from the blood cells.
- Serum and plasma must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 8 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- It is advisable to assay serum samples.
- Do not use haemolysed samples.

Materials provided

Allow all reagents to reach room temperature before use.

1. **MPL**: **Microtiterplate** with 96 anti PTH (polyclonal antibodies) coated breakable wells; ready to use.
2. **CAL0**: **Zero Calibrator** in human plasma and thymol; 1 vial lyophilized; add 3.0 mL aqua dest.
3. **CAL1**-**CAL5**: **Calibrators** in human plasma and thymol; 5 vials lyophilized; add 1.0 mL aqua dest.; exact concentration see bottles.
4. **CO1**; **CO2**: **2 controls** in human plasma with thymol; 2 vials lyophilized; add 1.0 mL aqua dest.
5. **WASH**: **Wash solution** NaCl-Tween20; 1 vial 25 mL; dilute 28 x with aqua dest. Prepare an adequate volume of working solution by adding 27 volumes of distilled water to 1 volume of **WASH** (28x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused working wash solution at the end of the day.
6. **CONJ**: **Conjugate**; HRP labelled anti-PTH (monoclonal antibodies) in TRIS-maleate buffer with bovine serum albumin; thymol and sheep serum; 1 vial 11 mL; ready for use.
7. **INCBU**: **Incubation buffer** with EDTA, benzamidin and azide < 0.1%; 1 vial 6 mL; ready to use.
8. **SUB**: **Chromogenic TMB Solution** (Tetramethylbenzidine); 1 x 25 mL; ready to use;
9. **STOP**: **Stop solution**; HCl 1 N; 1 vial; 25 mL; ready to use.

Note:

1. Use **CAL0** for sample dilutions.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 pg of a synthetic PTH (1-84) from the Japanese Peptide Institute.

Materials required but not provided in the kit

- High quality aqua dest.
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 mL, 2 mL and 3 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
- Washer for microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)

Assay procedure

General remarks

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform **CAL**, **CO** and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the **WASH**.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the **SUB** and the **STOP** avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- To avoid drift, the time between pipetting of the first **CAL** and the last sample must be no longer than 60 minutes.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- Dispense the **SUB** within 15 minutes following the washing of the **MPL**.
- During incubation with **SUB**, avoid direct sunlight on the **MPL**.

Test procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 50 µL of **INCBU** into all wells.
4. Pipette 200 µL of each **CAL**, **CO** and sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 4 times by dispensing 400 µL of diluted **WASH** into each well and aspirating the content of each well.
8. Pipette 100 µL of **CONJ** into all the wells.
9. Incubate for 1 hour at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirate the liquid from each well.
11. Wash the plate 4 times by dispensing 400 µL of diluted **WASH** into each well and aspirating the content of each well.
12. Pipette 100 µL of the **SUB** into each well within 15 minutes following the washing step.
13. Incubate the **MPL** for 30 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
14. Pipette 200 µL of **STOP** into each well.
15. Read the absorbance at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as next.

or fully automated on:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Quardette**
- **IASON® Gladiator**

Calculation of results

Polychromatic reading

In this case, the software will do the data processing.

1. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
3. The Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
4. The principle of polychromatic data processing is as follows:
Xi = OD at 450 nm
Yi = OD at 490 nm
Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated: $Y = A \cdot X - B$
If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i
If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B) / A$
A 4 parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
The PTH concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

Bichromatic reading

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of PTH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

Typical data

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

EIASON® hPTH		OD _{units}
CAL	0.0 pg/mL	0.050
	22 pg/mL	0.149
	70 pg/mL	0.344
	224 pg/mL	0.999
	666 pg/mL	2.721
	1400 pg/mL	4.483

Expected Values

	pg/mL
Normal subjects	16 – 46
Hyperparathyroidism	106 - > 1000
Hypoparathyroidism	0 – 6.4

It is recommended that each laboratory determine a reference range for its own patient population. The range is based on 5% to 95% percentiles.

Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON GmbH directly.

Test characteristics

Detection limit

Twenty **CAL0** were assayed along with a set of other **CAL**. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 2 pg/mL.

Specificity

Cross-reactive hormones or fragments were added to the zero calibrator, a high value calibrator (900 pg/mL) and a low value calibrator (100 pg/mL). The apparent PTH response was measured.

Cross-reactant	No significant interference up to
PTH 1-34 synthetic fragment, human	1000 pg/mL
PTH 44-68 synthetic fragment, human	20000 pg/mL
PTH 53-84 synthetic fragment, human	20000 pg/mL
PTH 73-84 synthetic fragment, human	100000 pg/mL
PTH-related protein 1-34 synthetic fragment, human	100000 pg/mL

Precision

Intra-Assay Precision				Inter-Assay Precision			
Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)
A	10	41.0 ± 0.5	1.1	A	20	45.7 ± 3.3	7.1
B	10	594 ± 12	2.0	B	20	381 ± 11.1	2.9

Accuracy

Recovery test

Sample	Added PTH (pg/mL)	Recovery PTH (pg/mL)	Recovery (%)
Serum	371	333	90
Heparin Plasma	371	347	93
EDTA Plasma	371	350	94

Dilution test

Sample	Dilution	Theoretical concent. (pg/mL)	Measured concent. (pg/mL)
Serum	1/1	-	955
	1/2	477	506
	1/4	239	229
	1/8	119	124
	1/16	60	63
	1/32	34	34

Samples were diluted with **CAL0**.

Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 60 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

	0´	15´	30´	45´	60´
S1	158	146	166	144	137
S2	77	72	70	67	72
S3	328	320	323	342	357
S4	260	250	250	258	251

Legal aspects***Reliability of results***

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON.

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

Useful publications

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

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature before use

1. Pipetting	INCBU	50µL	
2. Pipetting	CAL0 – CAL5 200µL	CO1, CO2 200µL	sample 200µL
3. Incubation	2 hours at room temperature (18 – 25°C) on a shaker (700 rpm)		
4. Washing	Aspirate or decant and wash with 400µL WASH repeat 3 times, remove remaining liquid by hitting the plate against paper towel		
5. Pipetting	CONJ	100µL	
6. Incubation	1 hour at room temperature (18-25°C) on a shaker (700 rpm)		
7. Washing	Aspirate or decant and wash with 400µL WASH repeat 3 times, remove remaining liquid by hitting the plate against paper towel		
8. Pipetting	SUB	100µL	
9. Incubation	30 min at room temperature (18-25°C) on a shaker (700 rpm)		
10. Pipetting	STOP	200µL	
11. Reading	450nm (RF 630/650nm) and/or 490 nm (RF 630/650 nm) Calculation: 4-Parameter or Point To Point		

Expected Values

	pg/mL
Normal subjects	16 – 46
Hyperparathyroidism	106 - > 1000
Hypoparathyroidism	0 – 6.4