

Intakt-PTH [Parathormon] ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay]

REF 7022

Spezifischer quantitativer Assay zur Bestimmung von Intakt-Parathormon in Serum

Januar 2018



I. BESTIMMUNGSGEMÄSSE ANWENDUNG

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

II. EINFÜHRUNG UND BESCHREIBUNG

PTH (Parathormon, Parathyrin, Parathyroidhormon) wird in den Nebenschilddrüsen als Präproparathormon, eine größere molekulare Hormonvorstufe, die aus 115 Aminosäuren besteht, biosynthetisiert. Das Präproparathormon wird nach einer sequenziellen intrazellulären Spaltung einer Sequenz von 25 Aminosäuren in die Hormonvorstufe Parathormon, ein Polypeptid aus 90 Aminosäuren, umgewandelt. Durch weitere proteolytische Modifikationen wird das Parathormon in Parathormon, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, umgewandelt. Bei gesunden Personen erfolgt die Regulierung der Parathormonsekretion durch eine negative Rückkopplungswirkung des Serumcalciums auf die Nebenschilddrüsen. Intaktes PTH ist biologisch aktiv und wird mit einer Halbwertszeit von weniger als vier Minuten¹ rasch aus dem Kreislauf eliminiert. PTH wird in den Nebenschilddrüsen, jedoch hauptsächlich peripher - insbesondere in der Leber, aber auch in den Nieren und Knochen - proteolytisch gespalten, wobei N-terminale sowie längerlebige C-terminale und mittregionale Fragmente entstehen. Personen mit Niereninsuffizienz weisen in PTH-Tests zur Feststellung von C-terminalen und mittregionalen Fragmenten typischerweise erhöhte Werte auf, wie sie auch mit einer verminderten renalen Clearance einhergehen².

III. KLINISCHE BEDEUTUNG

iPTH-Assays sind für die Abgrenzung des primären Hyperparathyreoidismus von anderen (nicht durch die Nebenschilddrüsen bedingten) Ursachen der Hyperkalzämie wie bösartige Gewebeveränderungen, Sarkoidose und Hyperthyreose von großer Bedeutung. Die Messung des Parathormons ist das spezifischste Verfahren zur Diagnose eines primären Hyperparathyreoidismus. Liegt eine Hyperkalzämie vor, kann bei einem gleichzeitig angegebenen Parathormonspiegel die Diagnose sehr praktisch gestellt werden. Bei über 90 % der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus ist die Konzentration des Parathormons erhöht³.

Die häufigste sonstige Ursache einer Hyperkalzämie, eine maligne Grunderkrankung, geht mit supprimierten Konzentrationen des Parathormons³ bzw. PTH-Konzentrationen innerhalb des Normbereichs einher⁴. Werden die Konzentrationen von iPTH und Serumcalcium zeichnerisch dargestellt, ist der bei Patienten mit einer durch Malignome bedingten Hyperkalzämie festgestellte iPTH-Spiegel fast immer unverhältnismäßig niedrig, wenn diese Werte im Zusammenhang mit den erhöhten Serumcalciumspiegeln interpretiert werden^{3,4,5}.

Im Gegensatz zu C-terminalen und mittregionalen Fragmenten, deren Werte bei Personen mit Niereninsuffizienz typischerweise extrem erhöht sind, zeigen iPTH-Assays eine weniger starke Beeinflussung durch die abnehmende Nierenfunktion⁵.

PTH-Werte sind bei einer Hypokalzämie durch totalen Hypoparathyreoidismus typischerweise nicht nachweisbar. Sie liegen jedoch innerhalb des Normbereichs bei einer durch partiellen Verlust oder Hemmung der Nebenschilddrüsen-Funktion bedingten Hypokalzämie.

IV. GRUNDLAGEN DES TESTS

Der Intakt-PTH Immunoassay von Biomerica ist ein an zwei Stellen ansetzender ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] zur Messung des 84 Aminosäuren langen biologisch intakten Parathormons (PTH 1-84). Zwei verschiedene polyklonale Ziege-Antikörper gegen humanes PTH wurden affinitätschromatographisch gereinigt und sind für hinreichend definierte Regionen des PTH-Moleküls spezifisch. Ein Antikörper ist regionsspezifisch gegen die mittregionale und C-terminale Aminosäuresequenz 39-84. Dieser Antikörper ist biotinyliert.

Der andere Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen die N-terminale Aminosäuresequenz 1-34. Dieser Antikörper ist als Detektionsantikörper mit Meerrettich-Peroxidase [HRP] markiert.

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

Obwohl mittregionale und C-terminale Fragmente durch das biotinylierte anti-PTH 39-84 gebunden werden, bildet nur iPTH 1-84 den zum Nachweis erforderlichen Sandwich-Komplex. Die Kapazitäten der biotinylierten Antikörper und der mit Streptavidin beschichteten Kavitäten (Wells) der Mikrotiterplatte wurden so angepasst, dass inaktive Fragmente das Ergebnis selbst bei höheren Konzentrationen nur in irrelevantem Maße beeinflussen.

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten. Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration an intaktem PTH in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die Konzentrationen an intaktem PTH in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt.

V. KIT-KOMPONENTEN

Testkit-Komponenten	Bezeichnung	Menge
RGT 1 = Reagenz 1	Biotinylierter PTH-Antikörper	1 x 7,0 ml
RGT 2 = Reagenz 2	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter PTH-Antikörper	1 x 7,0 ml
RGT B = Reagenz B	TMB-Substrat [Tetramethylbenzidin]	1 x 20 ml
RGT 3 = Reagenz 3	Verdünnungspuffer [Pferdeserum] für Patientenproben mit Werten außerhalb des Messbereichs	1 x 2 ml
RGT A = Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergens]	1 x 30 ml
SOLN = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N Schwefelsäure]	1 x 20 ml
RGT 4 = Reagenz 4	Rekonstitutionslösung mit Detergens	1 x 5 ml
PLA = Mikrotiterplatten	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen à 8 Wells
CAL = Kalibratoren A: 0 pg/ml B: Genaue C: Konzentrationen D: auf E: auf F: Flaschenetiketten	Lyophilisiertes synthetisches h-PTH. Lyophilisierter Nullkalibrator [BSA/Ziegenserum-Lösung]. Alle anderen Kalibratoren enthalten synthetisches h-PTH 1-84 in BSA/Ziegenserum-Lösung.	1 x 1 ml je Level
CTRL = Kontrollen 1 & 2 Genaue Bereiche auf Flaschenetiketten	Lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h-PTH 1-84 in BSA/Ziegenserum-Lösung].	1 x 1 ml je Level

WEITERE ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN UND GERÄTE

- Mikrotiterplatten-Lesegerät
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 25, 100 und 150 µl
- (Optional): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 50, 100 und 150 µl
- Mikrotiterplattenschüttler: Biomerica hat die folgenden Drehzahleinstellungen für die einzelnen Schütteldurchmesser ermittelt, bei denen die Streptavidin-Kits ihre optimale Leistungsreaktion behalten:

Mikrotiterplattenschüttler	Schütteldurchmesser	Drehzahleinstellung
Orbital	3 mm (0.118 in)	600 ± 10 U/min
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 U/min
Linear	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 U/min

VI. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieses Testkits sind spezifisch so beschaffen, dass sie keine humanen Blutkomponenten enthalten. In den humanen Patientenproben kann das Vorhandensein von HBsAg, HBCAg bzw. HIV-Antikörpern jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Die bei ungetesteten Patientenproben üblichen Vorsichtsmaßnahmen gelten auch für den Umgang mit diesem Material.

Die Stopplösung besteht aus 1 N Schwefelsäure. Dies ist eine starke Säure. Obwohl sie verdünnt ist, ist sie mit Sorgfalt zu handhaben. Sie kann Verätzungen verursachen. Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Schutzkleidung sind zu tragen. Verschüttete Säure ist vor dem Aufwischen mit großen Mengen Wasser zu verdünnen. Dämpfe nicht einatmen.

Im Handel sind verschiedene Schüttlertypen mit unterschiedlichen technischen Daten erhältlich. Falls der im Labor eingesetzte Mikrotiterplattenschüttler andere als die oben angegebenen Daten aufweist, sollten Sie selbst die optimale Einstellung ermitteln.

VII. PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

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

VIII. VORBEREITEN UND AUFBEWAHREN VON REAGENZIEN

Alle Testkit-Komponenten bei 2-8 °C lagern.

Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern.

Jeden der Kalibratoren (Kalibrator A bis F) und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 500 µl des Reagenz 4 (Rekonstitutionslösung) rekonstituieren und mischen. Flasche 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20°C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -20°C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.

1. Reagenz A: Waschkonzentrat: Inhalt gründlich mischen. Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4°C eingetreten, ist das Präzipitat durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad oder einen Laborofen bei 37°C und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 ml) zu 570 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

IX. TESTVERFAHREN

- Eine für alle sechs (6) PTH-Kalibratoren, A – F der Intakt-PTH-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Qualitätskontrollseren und Patientenproben ausreichende Anzahl **Streptavidin-beschichteter Streifen** in die Halterung einsetzen. Mindestens zwei Wells vorsehen, die als „Blindproben“ dienen. Siehe Schritt 9 zum endgültigen Ablesen der Platte.
- 25 µl** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen oder gekennzeichneten Wells pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20°C).**
- 50 µl** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Wells, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
- 50 µl** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Wells pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten. Platte **3 Stunden ± 30 Minuten** bei Raumtemperatur (22°-28°C) auf einem **Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt V).
- Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Wells fünf (5) Mal mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf 0,35 ml je Well einzustellen.
- 150 µl** des Reagenz B (TMB-Substratlösung) in jede der Wells pipettieren bzw. dispensieren.
- Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22°-28°C) auf einem **Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt V).
- 100 µl** der Stopplösung in jede der Wells pipettieren bzw. dispensieren. Vorsichtig mischen.
- Innerhalb von 10 Minuten die Absorption der Lösung in den Wells mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät messen, das auf **450 nm** eingestellt ist. Vor der Messung sicherstellen, dass beide Blindproben gemäß Schritt 1 mit 250 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllt sind. Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen.

Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 700 – 1 000 pg/ml) auszuweiten. Somit können Patientenproben mit PTH > 200 pg/ml gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in

sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Im Allgemeinen sind Patienten- und Kontrollproben bei PTH-Konzentrationen von bis zu 200 pg/ml bei 450 nm abzulesen. PTH-Konzentrationen oberhalb von 200 pg/ml werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

- Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte kann eine Kalibrationskurve mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der intakten PTH-Konzentration erstellt.

VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

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

X. BERECHNEN DER ERGEBNISSE

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

Wichtiger Hinweis: Wenn sich für Kalibrator A (OD 450 nm) nach der LeerwertEinstellung ein Wert von $\geq 0,100$ ergibt, ist die Kurve ungültig und es dürfen die Patientenergebnisse nicht protokolliert werden.

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

Mikrotiterplatten-Well	1. Messung Absorptions-einheit	2. Messung Absorptions-einheit	Mittelwert Absorptions-einheit	Intakt-PTH pg/ml	Intakt-PTH pg/ml – Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,020	0,016	0,018		0
Kalibrator B	0,056	0,051	0,054		7
Kalibrator C	0,124	0,119	0,122		18
Kalibrator D	0,388	0,393	0,391		55
Kalibrator E	1,335	1,340	1,338		210
Kontrolle 1	0,200	0,200	0,200	27,6	27,6
Kontrolle 2	0,804	0,794	0,799	119	119
Patientenprobe 1	0,147	0,136	0,142	19,1	19,1
Patientenprobe 2	0,407	0,409	0,408	58,5	58,5
Patientenprobe 3	2,375	2,454	2,415	> 200	*
Patientenprobe 4	3,725	3,725	3,725	> 200	*

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

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

Mikrotiterplatten-Well	1. Messung Absorptions-einheit	2. Messung Absorptions-einheit	Mittelwert Absorptions-einheit	Intakt-PTH pg/ml	Intakt-PTH pg/ml – Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,014	0,008	0,011		0
Kalibrator D	0,124	0,128	0,126		55
Kalibrator E	0,428	0,425	0,427		210
Kalibrator F	1,309	1,317	1,313		700
Kontrolle 1	0,074	0,066	0,070	< 200	¶
Kontrolle 2	0,260	0,251	0,256	121	II
Patientenprobe 1	0,049	0,043	0,046	< 200	¶
Patientenprobe 2	0,132	0,133	0,133	< 200	¶
Patientenprobe 3	0,758	0,782	0,770	401	401
Patientenprobe 4	1,314	1,321	1,318	> 700	∞

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

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

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

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

Biomerica ELISA = 1,06 ELISA Kit - 1,49 pg/mL $r = 0,998 \quad N = 309$
--

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze ist bei diesem Test als der kleinste Einzelwert definiert, der bei einer Vertrauensgrenze von 95 % von Null unterschieden werden kann. Der Biomerica PTH ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,57 pg/ml.

Spezifität und Kreuzreaktivität

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

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

Humanes PTH 7-84 in einer Konzentration bis 1.000 pg/ml wies eine Kreuzreaktivität von 44,5 % auf.

Genauigkeit und Reproduzierbarkeit

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

Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert [pg/ml]	n	Variationskoeffizient [%]
A	32,4	25	6,08
B	178,2	25	3,68

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

Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert [pg/ml]	n	Variationskoeffizient [%]
A	30,3	21	3,6
B	159,1	21	2,8

Wiederfindung

Drei verschiedene Patientenserum wurden zur Bestimmung der Wiederfindung mit unterschiedlichen Mengen PTH 1-84 versetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

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

Durchschnittswert 103 %

XI. QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollseren oder Serumpools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mithilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Liegen bei einem Test einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden. Wenn sich für Kalibrator A (OD 450 nm) nach der LeerwertEinstellung ein Wert von $\geq 0,100$ ergibt, ist die Kurve ungültig und es dürfen die Patientenergebnisse nicht protokolliert werden.

XII. GRENZEN DES VERFAHRENS

Das Biomerica PTH ELISA Testkit zeigt keinen „High-dose-hook-Effekt“ bei Proben, die mit 2.100.000 pg/ml intaktem PTH versetzt sind. Proben mit intakten PTH-Konzentrationen höher als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen. Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind intakte PTH-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren.

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen PTH und Calcium bei verschiedenen Erkrankungen müssen PTH-Ergebnisse im Kontext von Serumcalcium und der Krankengeschichte des Patienten interpretiert werden.

Der Intakt-PTH ELISA von Biomerica erkennt Non-Intakt-PTH (1-84) wie z. B. PTH-Fragment (7-84). PTH-Fragment (7-84) kann zu fälschlicherweise erhöhten Intakt-PTH-Ergebnissen bei Patienten mit abnormaler Nierenfunktion führen, da diese Patienten unterschiedliche Konzentrationen von PTH-Fragment (7-84) im Blut haben können. Bei Patienten mit abnormaler Nierenfunktion die Intakt-PTH-Ergebnisse mit Vorsicht interpretieren und Entscheidungen zur Patientenbehandlung nicht allein auf das Intakt-PTH-Ergebnis stützen.

Proben von Patienten, die regelmäßig Tier- oder Tierserumprodukten ausgesetzt sind, können heterophile Antikörper enthalten, welche mit der Antikörperreagenz reagieren, was zu fälschlicherweise erhöhten Ergebnissen führen kann. Dieser Assay wurde so formuliert, dass das Risiko einer solchen Art der Ergebnisbeeinflussung abgeschwächt ist. Dennoch können Wechselwirkungen zwischen Patientenserum und Testkomponenten auftreten.

XIII. ERWARTETE WERTE

Mithilfe des Intakt-PTH ELISA wurden in den USA bei 148 scheinbar gesunden Probanden Intakt-PTH-Konzentrationen gemessen. Die ermittelten Werte lagen in einem Bereich von 9,0 bis 94 pg/ml für Serum. Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzessverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung. Das geometrische Mittel ± 2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab einen Bereich von 10,4 bis 66,5 pg/ml für Serum.

XIV. KENNGRÖSSEN

Rückverfolgbarkeit

Die Intakt-PTH-Kalibratoren von Biomerica sind gemäß der internationalen WHO-Norm NIBSC 95/646 für rekombinantes PTH (1-84) rückverfolgbar.

1,0 pg/ml = 1,07 pg/ml NIBSC 95/646

Genauigkeit

Dreihundertneun (309) Patientenproben mit Intakt-PTH-Werten zwischen 1,0 und 833 pg/ml wurden mit dem vorherigen Biomerica-PTH-Kit und dem aktualisierten Biomerica-PTH-Kit getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

Linearität von Patienten-Probendilutionen: Parallelismus

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

Probe	Verdünnung	Erwartet	Beobachtet	% Beobachtet ÷ Erwartet
A	Unver-dünnt	-	322	-
	1:2	161	148	92 %
	1:4	80,5	73,1	91 %
	1:8	40,3	41,5	103 %
B	Unver-dünnt	-	230	-
	1:2	115	97	84 %
	1:4	58	55	95 %
	1:8	29	30	103 %
C	Unver-dünnt	-	176	-
	1:2	88	82	93 %
	1:4	44	45	102 %
	1:8	22	24	109 %
D	Unver-dünnt	-	426	-
	1:2	213	192	90 %
	1:4	107	90	84 %
	1:8	53	47	89 %

Durchschnittswert 95 %









XV. LITERATUR

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

Weiterführende Literatur:


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

XVI. SYMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Chargencode
	Ablaufdatum
	Hersteller
	Bevollmächtigter Vertreter
	Vorsicht, siehe Anweisungen
	Für die Verwendung in der In-vitro-Diagnose
	Katalog-Nr.

XVI. BESTELLINFORMATIONEN

BESTELLUNGEN: Bestellungen sind zu richten an:

 BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, CA 92614
USA

2°C/8°C






Tel.: (949) 645-2111
Fax: (949) 553-1231
Website: www.biomerica.com
E-Mail: bmra@biomerica.com

67022-16_ger.doc

January 2018



gemäß IVDD 98/79/ EC
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Deutschland