

Ein Enzymimmunoassay für die Quantifizierung von intaktem Parathormon (PTH) im Humanserum

MicroVue™ Intakt-PTH ELISA – Zusammenfassung

Reagenz, Standardlösungen, Kontrollen und Vorbereitung von Proben

- ❑ Konzentrierten Waschlösung im Verhältnis **1:20** mit entionisiertem Wasser verdünnen. Bei Raumtemperatur aufbewahren.
- ❑ 10 Minuten vor Anwendung jedes Fläschchen der Standardlösungen und Kontrollen mit 500 µl Rekonstitutionspuffer wiederherstellen.

Testverfahren

Je **25 µl**, Standardlösungen, Kontrollen und Proben in die Testvertiefungen pipettieren

Je **50 µL** von bioinylierten Antikörpern und **50 µL** von enzymmarkierten Antikörpern in die Testvertiefungen pipettieren

Bei 22–28 °C für **3 Stunden ±30 Minuten** unter Schütteln (170 ±10 U/min) im Dunkeln inkubieren

*Mit 1x-Waschlösung
fünfmal wasch*

Je **150 µL** Substratlösung pipettieren

Bei 22–28 °C für **30 ±5 Minuten** unter Schütteln (170 ±10 U/min) im Dunkeln inkubieren

Je **100 µL** Stopplösung pipettieren
(Ergebnisse innerhalb von 10 Minuten ablesen)

Optische Dichte bei **450 nm** und **erneut bei 405 nm** ablesen. Die Testergebnisse mithilfe eines kubischen Splines, einer 4-Parameter-Kurvenanpassung oder einer Punkt-zu-Punkt-Interpolation analysieren

VERWENDUNGSZWECK

Das MicroVue PTH-Enzymimmunoassay-Kit misst die Menge von intaktem Parathormon (PTH) im Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

PTH (Nebenschilddrüsenhormon, Parathormon, Parathyrin) wird in den Nebenschilddrüsen als ein Präparathormon – eine größere molekulare Hormonvorstufe, die aus 115 Aminosäuren besteht – biosynthetisiert. Das Präparathormon wird nach einer sequenziellen intrazellulären Spaltung einer Sequenz von 25 Aminosäuren in die Hormonvorstufe Parathormon umgewandelt, ein Polypeptid aus 90 Aminosäuren. Durch weitere proteolytische Modifikationen wird das Parathormon in Parathormon, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, umgewandelt. Bei gesunden Personen erfolgt die Regulierung der Parathormonsekretion über eine negative Rückkopplungswirkung des Serumkalziums auf die Nebenschilddrüsen. Intaktes PTH ist biologisch aktiv und wird mit einer Halbwertszeit von weniger als vier Minuten¹ sehr schnell aus dem Kreislauf eliminiert. PTH wird in den Nebenschilddrüsen, jedoch hauptsächlich peripher – insbesondere in der Leber, jedoch auch in den Nieren und Knochen – proteolytisch gespalten, wodurch N-terminale sowie längerlebige C-terminale und mittregionale Fragmente entstehen. Testpersonen mit Niereninsuffizienz weisen in PTH-Tests zur Feststellung von C-terminalen und mittregionalen Fragmenten typischerweise erhöhte PTH-Werte auf, wie sie auch mit einer verminderten renalen Clearance einhergehen.²

iPTH-Assays sind wichtig für die Differenzierung des primären Hyperparathyreoidismus von anderen (nicht durch die Nebenschilddrüsen bedingten) Formen der Hyperkalzämie wie bösartigen Gewebeveränderungen, Sarkoidose und Thyreotoxikose.² Die Messung des Parathormons ist das spezifischste Verfahren zur Diagnostizierung eines primären Hyperparathyreoidismus. Wenn eine Hyperkalzämie vorliegt, wird die Diagnose durch einen erhöhten Parathormonspiegel quasi besiegelt. Bei über 90 % der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus ist der Parathormonwert erhöht.³

Maligne Hyperkalzämie hängt mit einer supprimierten Konzentration des Nebenschilddrüsenhormons bzw. PTH-Konzentrationen innerhalb des Normbereichs zusammen. Werden die Konzentrationen von intaktem PTH und Serumkalzium zeichnerisch dargestellt, ist der bei Patienten mit einer durch Malignome bedingten Hyperkalzämie festgestellte Intakt-PTH-Spiegel fast immer unverhältnismäßig niedrig, wenn diese Werte im Hinblick auf den erhöhten Serumkalziumspiegel interpretiert werden.³⁻⁵

Im Gegensatz zu C-terminalen und mittregionalen PTH-Fragmenten, deren Werte bei Testpersonen mit Niereninsuffizienz typischerweise extrem erhöht sind, werden iPTH-Assays weniger stark durch die abnehmende Nierenfunktion⁵ beeinflusst.

PTH-Werte sind bei einer durch totalen Hypoparathyreoidismus verursachten Hypokalzämie normalerweise nicht nachweisbar. Bei einer durch partiellen Verlust oder Hemmung der Nebenschilddrüsenfunktion bedingten Hypokalzämie liegen sie jedoch innerhalb des Normbereichs.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue iPTH-Enzymimmunoassay zur Quantifizierung von inaktivem PTH im Humanserum ist ein zweistufiges Verfahren unter Einsatz (1) einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte und eines biotinylierten, polyklonalen Ziegen-Antikörpers, der spezifisch an humane mittregionale und C-terminale PTH-Fragmente (39-84) bindet; (2) eines HRP-konjugierten polyklonalen Ziegen-Antikörpers, der spezifisch gegen humane N-terminale PTH-Fragmente (1-34) ist; (3) eines chromogenen Substrats.

In Schritt 1 werden Standardlösungen, Kontrollen und Testproben in die mit Streptavidin beschichteten Mikroassay-Vertiefungen gegeben. Der Biotin-konjugierte, primäre, polyklonale, anti-humane mittregionale und C-terminale

PTH-Antikörper (39-84) und der HRP-konjugierte, sekundäre, polyklonale, anti-humane und N-terminale PTH-Antikörper (1-34) werden in jede Testvertiefung gegeben. Die Erfassung des in den Standardlösungen, Kontrollen oder Proben vorhandenen intakten PTHs in den Mikroassay-Vertiefungen erfolgt durch Bindung des biotinylierten primären Antikörpers an das an der Platte immobilisierte und simultan durch den HRP-konjugierten sekundären Antikörper nachgewiesene Streptavidin. Am Ende der Inkubation wird durch einen Waschzyklus ungebundenes Material entfernt.

In Schritt 2 wird in jede Mikroassay-Vertiefung ein chromogenes Enzymsubstrat gegeben. Das gebundene HRP-Konjugat reagiert mit dem Substrat und bildet dabei eine blaue Farbe. Nach einer Inkubationszeit wird die Enzymreaktion chemisch gestoppt, was zu einer Farbänderung von blau zu gelb führt. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Farbintensität der Reaktionsmischung verhält sich proportional zu der iPTH-Konzentration in den Testproben, Standardlösungen und Kontrollen.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Assays für Intakt-PTH (intaktem Parathormon)

Das MicroVue iPTH-Enzymimmunoassay-Kit enthält folgende Komponenten:

A	PTH Standardlösungen	Artikelnr. CAL. A – CAL. F	je 0,5 ml
I	Lyophilisiert. Enthält jeweils gereinigtes synthetisches Human-PTH-Peptid mit einer zugewiesenen Proteinkonzentration (pg/ml) in BSA/Ziegen Serum-Lösung. Nullstandard = BSA/Ziegen Serum-Lösung		
L	PTH-Kontrolle 1	Artikelnr. CTRL 1	0,5 ml
	Lyophilisiert. Enthält synthetisches Human-PTH-Peptid mit einer zugewiesenen Proteinkonzentration (pg/ml) in BSA/Ziegen Serum-Lösung.		
H	PTH-Kontrolle 2	Artikelnr. CTRL 2	0,5 ml
	Lyophilisiert. Enthält synthetisches Human-PTH-Peptid mit einer zugewiesenen Proteinkonzentration (pg/ml) in BSA/Ziegen Serum-Lösung.		
↑	Mikroassay-Platte	Artikelnr. PLA	12 x 8 Vertiefungen
	Mit Streptavidin beschichtete Streifen mit acht Vertiefungen in einem wiederverschließbaren Folienbeutel		
	StoppLösung	Artikelnr. SOLN	20 ml
	Enthält 1 N (3 %) Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)		
	20-faches Waschkonzentrat	Artikelnr. RGT A	30 ml
	Enthält Salzlösung mit Tensid		
	Probenverdünnungsmittel	Artikelnr. RGT 3	2 ml
	Enthält Pferdeserum		
	TMB-Substrat	Artikelnr. RGT B	20 ml
	Gebrauchsfertig. Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)		
☑	Biotinylierter PTH-Antikörper	Artikelnr. RGT 1	7 ml
	Enthält Biotin-konjugierten, polyklonalen, anti-humanen mittregionalen und C-terminalen PTH-Antikörper (39-84)		
☑	Enzymmarkierter PTH-Antikörper	Artikelnr. RGT 2	7 ml
	Enthält HRP-konjugierten, polyklonalen, anti-humanen und N-terminalen PTH-Antikörper (1-34)		
☒	Rekonstitutionslösung	Artikelnr. RGT 4	5 ml
	Enthält Salzlösung mit Tensid		

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)

- Stoppuhr (über einen Bereich von 60 Minuten)
- Saubere, unbenutzte Mikroassay-Platten, Verdünnungsplatte mit 96 Vertiefungen bzw. Proberöhrchen und Ständer
- Behälter für die Verdünnung des Waschpuffers
- Waschflasche oder anderes validiertes, für Immunoassays geeignetes Waschsysteem
- Mikropipetten und sterile Einwegpipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanalpipette (8 oder 12 Kanäle) oder Mehrfachmikropipetten
- Saubere Pipetten, 1 ml, 5 ml und 10 ml

- Reagenzienbehälter zum Hinzufügen von Konjugat, Substrat- und Stopplösung auf der Platte (für jedes Reagenz saubere, noch nicht verwendete Behälter verwenden)
- Plattenlesegerät, das A₄₅₀- und A₄₀₅-Messungen zwischen 0,0 und 4,0 vornehmen kann
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Orbitalschüttler/Rotator (170 ± 10 U/min)

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zum *In-vitro*-Gebrauch.
2. Intakt-PTH 1-84 ist ein sehr instabiles Molekül. Nach der Rekonstitution bzw. nach dem Auftauen sämtlicher Standardlösungen, Kontrollen und Patientenproben sofort mit dem Test beginnen.
3. Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Bei der Arbeit mit diesem Kit und den Patientenproben die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.⁷
4. Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille bzw. Gesichtsschutz tragen.
5. Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
6. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht untereinander vertauscht werden.
7. Die Testreagenzien wie angegeben lagern.
8. Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
9. Die Stopplösung ist ätzend und kann Reizungen verursachen. Nicht einnehmen. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen. Im Fall der Einnahme einen Arzt aufsuchen.
10. Für ein zügiges und effizientes Dosieren der Reagenzien wird der Gebrauch von Mehrkanal- oder Mehrfachpipetten empfohlen.
11. Um genaue Messungen zu gewährleisten, bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
12. Für den Erhalt genauer Ergebnisse müssen die Proben fachgerecht entnommen und aufbewahrt werden (siehe *PROBENBEHANDLUNG UND VORBEREITUNG*).
13. Eine mikrobielle Kontamination oder Kreuzkontamination von Proben und Reagenzien ist zu vermeiden.
14. Jede Probe als Doppelbestimmung messen.
15. Jede Mikroassay-Vertiefung jeweils nur für einen Test verwenden.
16. Wenn die Inkubationszeiten und -temperaturen bei der Testdurchführung von den Vorgaben im Abschnitt „Testverfahren“ abweichen, können falsche Ergebnisse auftreten.
17. Das TMB-Substrat muss während der Lagerung und Inkubation vor Licht und Kontakt mit Metall oder Gummi geschützt werden. Kontakt mit Augen, Haut und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt den betroffenen Bereich sofort mit Wasser spülen.
18. Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
19. Beim Entfernen von Flüssigkeiten aus den Mikroassay-Vertiefungen den Boden der Vertiefungen nicht ankratzen oder berühren.

20. Um beim Waschen die Bildung von Aerosolen zu vermeiden, eine Vorrichtung verwenden, mit der die Waschflüssigkeit in eine Flasche mit haushaltsüblichem Bleichmittel gesaugt wird.
21. Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (*TESTVERFAHREN*, Schritt 5). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassay-Platte verwenden.
22. Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit oder örtlich geltender Richtlinien entsorgen.
23. Weitere Informationen finden Sie auf dem Sicherheitsdatenblatt auf guidel.com.

LAGERUNG

Mit Ausnahme des Waschkonzentrats und der Stopplösung alle Komponenten des Kits bei 2–8 °C lagern. Alle Reagenzien außer den Standardlösungen, den Kit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien außer Waschkonzentrat und Stopplösung bei 2–8 °C lagern. Waschkonzentrat und Stopplösung sind bis zum Zeitpunkt der Verdünnung bei Raumtemperatur zu lagern, um Niederschlagsbildung zu vermeiden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien und Materialien vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.

Nach der Entnahme der benötigten Reagenzien und Materialien die nicht benötigten Komponenten wieder auf die entsprechende Lagertemperatur bringen (siehe *LAGERUNG*).

Mikroassay-Teststreifen

Die für den Test erforderliche Anzahl von Teststreifen bestimmen. Quidel empfiehlt Blindvertiefungen, Standardlösungen und Kontrollen in Doppelbestimmung zu testen. Die nicht benötigten Teststreifen entfernen und in den Aufbewahrungsbeutel legen. Den Beutel wieder verschließen und wieder auf 2–8 °C bringen. Die im Test verwendeten Teststreifen im Testplattenrahmen befestigen.

Waschlösung (RGT A)

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung durch mehrfaches Umdrehen der Flasche mischen. Wenn die 20-fach konzentrierte Waschlösung bei 2–8 °C gelagert wurde, haben sich u. U. Kristalle gebildet. Zum Auflösen dieser Kristalle die Flasche in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmen, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben, und anschließend sorgfältig mischen. Zur Vorbereitung der Waschlösung den gesamten Inhalt der Flasche mit 20-fach konzentrierter Waschlösung (30 ml) mit 570 ml vollentsalztem oder destilliertem Wasser verdünnen. Gründlich mischen. Wenn sie in einem sauberen Behälter bei Raumtemperatur aufbewahrt wird, ist die verdünnte Waschlösung 90 Tage lang haltbar.

Standardlösungen und Kontrollen

Jedes Fläschchen der Standardlösungen (CAL. A bis F) und Kit-Kontrollen 1 und 2 mit 500 µL der Rekonstitutionslösung (RGT 4) rekonstituieren und mischen. Fläschchen 10 Minuten ruhen lassen und anschließend durch vorsichtiges Kippen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution zu erzielen. Intakt-PTH ist ein sehr instabiles Molekül. Die Standardlösungen und Kontrollen sind sofort nach der Rekonstitution zu verwenden. Die übrigen Standardlösungen und Kontrollen sind nach der Verwendung so schnell wie möglich einzufrieren (-20 °C). Nach der Rekonstitution sind die Standardlösungen und Kontrollen bei -20 °C sechs Wochen lang haltbar und können bei empfohlener Handhabung maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Antikörper-Lösungen (optional)

Wahlweise gleiche Volumina des biotinylierten Antikörpers (RGT 1) und des enzymmarkierten Antikörpers (RGT 2) in einer sauberen braunen Flasche mischen und die erforderliche Menge für den Test vorbereiten. Anschließend in jede Vertiefung 100 µL der gemischten Antikörper geben. Diese alternative Methode ersetzt die Schritte 3 und 4 des Testverfahrens; anschließend folgt die Inkubation mit dem Orbitalschüttler.

PROBENNAHME UND ZUBEREITUNG

Bei der Handhabung und der Entsorgung aller Proben die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Probennahme

ACHTUNG: Alle Proben sind als potenziell infektiös zu behandeln. Allgemein übliche Vorsichtsmaßnahmen beachten. Kontaminierte oder falsch gelagerte Proben dürfen nicht verwendet werden.

Serum/Plasma

Die Bestimmung von intaktem PTH sollte mit EDTA-Plasma oder -Serum erfolgen. Berichten zufolge weist PTH in EDTA-Plasma eine höhere Stabilität auf als in EDTA-Serum.⁶ Die iPTH-Werte in EDTA-Plasma entsprechen daher u. U. in höherem Maße den *In-vivo*-Konzentrationen.

Serum- und EDTA-Plasma-Proben sollten unter aseptischen Bedingungen und unter Anwendung von Standardverfahren gesammelt werden.⁸ Nach der Blutgerinnung sollte das Serum oder EDTA-Plasma, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, sofort getrennt und bei höchstens -20 °C gelagert werden. Serum-Proben können bei 2–8 °C bis zu 8 Stunden gelagert werden. Auf -20 °C tiefgefrorene Serum-Proben sind bis zu 4 Monate stabil.

Probenverdünnung

Die Proben müssen verdünnt werden, sodass die gemessenen Werte den höchsten Standard (CAL. F, ungefähr 700–1.000 pg/ml) nicht übersteigen (siehe genaue Konzentrationsangabe auf dem Flaschenetikett). Proben, deren Werte außerhalb dieses Bereichs liegen, sind mit Probenverdünnungsmittel (RGT 3) zu verdünnen und in einem anderen Verdünnungsverhältnis erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Verdünnte Proben nicht aufbewahren oder wiederverwenden.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Siehe WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN und VORBEREITUNG DER REAGENZEN.

1. Eine für alle sechs (6) iPTH-Standardlösungen [A – F, genaue Konzentrationsangabe auf Flaschenetikett], Kit-Kontrollen und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen.
2. Je 25 µL Standardlösung, Kontrollen oder Proben in die dafür vorgesehene bzw. gekennzeichnete Vertiefung pipettieren. Die übrigen Standardlösungen und Kontrollen sind nach der Verwendung so schnell wie möglich einzufrieren (-20 °C).
3. 50 µL des biotinylierten Antikörpers (RGT 1) in jede Vertiefung, die bereits Standardlösungen, Kontrollen oder Proben enthält, pipettieren bzw. dispensieren.
4. 50 µL des enzymmarkierten Antikörpers (RGT 2) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Lichteinstrahlung zu vermeiden. Platte 3 Stunden ±30 Minuten bei Raumtemperatur (22–28 °C) auf einem Orbitalschüttler oder Rotator bei 170 ±10 U/min inkubieren.
5. Mikroassay-Vertiefungen nach einer der folgenden Vorgehensweisen waschen:
 - a. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - b. Mit einer Waschflasche oder einem automatisierten Plattenwaschgerät ca. 350 µL Waschlösung in jede Vertiefung geben.
 - c. Den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen.
 - d. Schritte a-c noch viermal (4x) wiederholen bzw. insgesamt fünf (5) Waschgänge durchführen.
6. 150 µL des TMB-Substrats (RGT B) in jede ausgewaschene Testvertiefung pipettieren bzw. dispensieren.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung 30 ±5 Minuten bei Raumtemperatur (22–28 °C) auf einem Orbitalschüttler oder Rotator bei 170 ±10 U/min inkubieren.
8. In jede Vertiefung 100 µl Stopplösung pipettieren oder dispensieren, um die enzymatische Reaktion zu stoppen.
9. Die Platte vorsichtig oben antippen, damit sich die Farbentwicklung gleichmäßig und vollständig verteilt.

10. Innerhalb von 10 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung (Schritt 8) die Absorption in der Testvertiefung bei 450 nm messen und in Übereinstimmung mit dem verwendeten Spektrophotometrie-System eine Blindwertkorrektur vornehmen. Anschließend Platte noch einmal bei 405 nm messen und in Übereinstimmung mit dem verwendeten Spektrophotometrie-System eine Blindwertkorrektur vornehmen (Blindwertkorrektur: gegen 250 µL destilliertes oder deionisiertes Wasser).

HINWEIS: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Wert

(ca. 700–1.000 pg/ml) auszudehnen. Somit können Patientenproben mit PTH >200 pg/ml gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Standard 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 über 200 pg/ml müssen mithilfe des Messwerts 405 nm interpoliert werden.

11. Die Konzentration der Proben und Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
12. Die übrigen verdünnten Proben, Substrate und verwendeten Mikroassay-Teststreifen entsorgen (siehe **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**).

QUALITÄTSKONTROLLE

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist chargenspezifisch und soll sicherstellen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen der Quidel Corporation entsprechen. Die angegebenen Extinktionswerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse können davon abweichen.

Die zu verwendenden Qualitätskontrollbereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte dienen zur Verifizierung der Gültigkeit der Kurven- und Probenergebnisse. Jedes Labor sollte eigene Kriterien für akzeptable Testgrenzwerte festlegen. Wenn die Kontrollwerte NICHT innerhalb des Akzeptanzbereichs Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse infrage gestellt und die Proben erneut getestet werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Verwendung der Standardkurve

Die Verwendung der in Schritt 10 des Testverfahrens ermittelten endgültigen Absorptionswerte ermöglicht das Erstellen einer Kalibrationskurve mithilfe von kubischen Splines, 4-Parameter-Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der iPTH-Konzentration. Diese Berechnungen können mit den meisten Plattenlese-Softwareprogrammen und Computern durchgeführt werden.

Alternativ können die Daten manuell grafisch dargestellt werden. Für die 450-nm-Messwerte mithilfe der ersten fünf gegebenen Standards (d. h. die Standards A–E) eine Kalibrationskurve erstellen. Für die 405-nm-Messwerte mithilfe der drei Standards mit den höchsten Konzentrationen (d. h. D–F) eine zweite Kalibrationskurve erstellen. Die Werte (pg/ml) der Testproben können direkt von der besten Anpassung der Kalibrationskurve abgelesen werden.

Tabelle 1: Probanddaten bei 450 nm

Probe	A ₄₅₀	pg/ml
Standardlösung A	0,018	0
Standardlösung B	0,054	7
Standardlösung C	0,122	18
Standardlösung D	0,391	55
Standardlösung E	1,338	210
Kontrolle 1	0,200	27,6
Kontrolle 2	0,799	119
Patientenprobe 1	0,142	19,1
Patientenprobe 2	0,408	58,5
Patientenprobe 3	2,415	*
Patientenprobe 4	3,725	*

* Da die gemessene Konzentration >200 pg/ml ist, sollten die bei 405 nm ermittelten Werte (siehe Tabelle 2 unten) verwendet werden.

Tabelle 2: Probanddaten bei 405 nm

Probe	A ₄₀₅	pg/ml
Standardlösung A	0,011	0
Standardlösung D	0,126	55
Standardlösung E	0,427	210
Standardlösung F	1,313	700
Kontrolle 1	0,070	*
Kontrolle 2	0,256	**
Patientenprobe 1	0,046	*
Patientenprobe 2	0,133	*
Patientenprobe 3	0,770	401
Patientenprobe 4	1,318	***

* Für Proben, deren Konzentration <200 pg/ml ist, sollten die bei 450 nm ermittelten Werte (siehe Tabelle 1 oben) verwendet werden. Dieses Verfahren erzielt die Testergebnisse mit optimaler Sensitivität.

** Auch wenn die gemessene Konzentration für Kontrolle 2 <200 pg/ml ist, sollte das tatsächliche Ergebnis gemessen und zur Bewertung der Qualitätskontrolle dokumentiert werden. Zudem ist die Absorption der Kontrolle 2 hoch genug, um eine analytische Gültigkeit zu erreichen.

*** Die gemessene Absorption liegt außerhalb bzw. über der durchschnittlichen Absorption des höchsten Standards. Die Probe muss unter Verdünnung wiederholt werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Der MicroVue PTH-ELISA hat bei aufgestockten Proben mit 2.100.000 pg/ml Intakt-PTH keinen „High-Dose-Hook-Effekt“ gezeigt. Um jedoch korrekte Werte zu erzielen, sollten Proben, deren iPTH-Werte über dem höchsten Standard liegen, verdünnt und erneut getestet werden. Wie bei jedem Analyten, der als diagnostisches Hilfsmittel dient, müssen die iPTH-Ergebnisse zusammen mit dem gesamten klinischen Befund und anderen unterstützenden diagnostischen Tests genau interpretiert werden.

PROBENWERTE

Serum-Proben von 148 offensichtlich gesunden Blutspendern wurden in dem MicroVue iPTH-Enzymimmunoassay-Kit getestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

Probe	N	Mittelwert ±2 SD (pg/ml)
Serum	148	10,4–66,5

HINWEIS: Die durchschnittliche Abweichung und die Standardabweichung (SD) der iPTH-Fragment-Konzentrationen, die in Serumproben gemessen werden, können von Labor zu Labor variieren. Daher wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Durchschnittswerte für die iPTH-Fragment-Konzentration und die Standardabweichung für Proben festlegt.

LEISTUNGSMERKMALE DES TESTS

Grenzen

LOD: Die Nachweisgrenze (Limit of Detection = LOD) des iPTH-ELISA liegt bei 1,57 pg/ml bzw. dem kleinsten Einzelwert, der an der 95%-Konfidenzgrenze von Null unterschieden werden kann.

Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde mithilfe von 25 Replikaten von zwei Proben bestimmt.

Probe	Mittelwert (pg/ml)	N	Intra-Assay C.V. (%)
Probe A	32,4	25	6,08 %
Probe B	178,2	25	3,68 %

Die Inter-Assay-Präzision wurde anhand von zwei Proben in 21 verschiedenen Assays von je drei Technikern an drei verschiedenen Reagenzien bestimmt.

Probe	Mittelwert (pg/ml)	N	Inter-Assay C.V. (%)
Probe A	30,3	21	3,6 %
Probe B	159,1	21	2,8 %

Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem Serumproben mit Probenverdünnungsmittel (RGT 3) verdünnt und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden. Die typischen Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

Probe	Verdünnungsfaktor	Erwartet (pg/ml)	Gemessen (pg/ml)	Wiederfindung (%)
A	Unverdünnt	–	322	–
	1:2	161	148	92
	1:4	80,5	73,1	91
	1:8	40,3	41,5	103
B	Unverdünnt	–	230	–
	1:2	115	97	84
	1:4	58	55	95
	1:8	29	30	103
C	Unverdünnt	–	176	–
	1:2	88	82	93
	1:4	44	45	102
	1:8	22	24	109
D	Unverdünnt	–	426	–
	1:2	213	192	90
	1:4	107	90	84
	1:8	53	47	89

Wiederfindung aufgestockter Proben

Die Wiederfindung aufgestockter Proben wurde bestimmt, indem Serumproben mit einer bekannten Menge PTH aufgestockt und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden.

Probe	PTH endogen (pg/ml)	PTH hinzugefügt (pg/ml)	Erwartungswert (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

KUNDENDIENST

Auskünfte zum Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort.

Weitere Informationen zu Quidel, unseren Produkten und unseren Vertretungen finden Sie auf unserer Website unter quidel.com.

LITERATURVERWEISE

1. Segre, G.V., Niall H.D., Habener J.F., Potts J.T. 1974. „Metabolism of parathyroid hormone: physiological and clinical significance“. *AM. J. MED.* 56(6): S. 774-784.
2. Mallette, L.E., Gagel, R.F. 1990. „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, S. 65-69.*
3. Bilezikian, J.P. 1990. „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, S. 109-111.*
4. Stewart, A.F. 1990. „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, S. 115-118.*
5. Mallette, L.E. 1991. „The parathyroid polyhormones: New concepts in the spectrum of peptide hormone action“. *ENDOCRIN REV.* 12: S. 110-117.
6. Kruger, L., Rosenblum, S., Zaazra, J., Wong, J. 1995. „Intact PTH is stable in unfrozen EDTA plasma for 48 hours prior to laboratory analysis“. *CLIN CHEM.* 41(6): S. 47.
7. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2007. *BIOSAFETY IN MICROBIOLOGICAL AND BIOMEDICAL LABORATORIES (BMBL) 5. AUFLAGE.* Washington: U.S. Government Printing Office.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.
8. Centers for Disease Control. 1987. „Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings“. *MMWR.* 36 (suppl. No. 2S): 001.

GLASSAR



VERWENDUNGSZWECK

REF 8044 – **MICROVUE** Intact PTH ELISA
Bone Health



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA | quidel.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany