

Immunoensayo enzimático para la Determinación de la Hormona Paratiroidea Intacta en Suero Humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorio clínico o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Hormona Paratiroidea Intacta

USO DESTINADO

Para la determinación de la Hormona Paratiroidea Intacta en el suero humano.

INTRODUCCIÓN

La PTH (Hormona paratiroidea, Parathormona, Paratirina) es una hormona pre-paratiroidea biosintetizada en la glándula paratiroidea, su precursor es una molécula larga que consiste en 115 aminoácidos. Posteriormente de forma intracelular se realiza una escisión de 25 aminoácidos en la secuencia de la hormona pre-paratiroidea convirtiéndola en un intermediario, un polipéptido de 90 aminoácidos de la hormona paratiroidea. Con una modificación proteolítica adicional, la hormona paratiroidea es convertida en hormona paratiroidea, un polipéptido de 84 aminoácidos. En individuos sanos, la regulación de la secreción de la hormona paratiroidea ocurre normalmente a través de una acción de retroalimentación negativa de calcio sérico en las glándulas paratiroideas. La PTH Intacta es biológicamente activa y se limpia muy rápidamente de la circulación con una vida media de alrededor de 4 minutos. La PTH se somete a una proteólisis en las glándulas paratiroideas, pero sobretodo la periferia especialmente en el hígado, pero también en los riñones y huesos para dar N-terminal de los fragmentos más largos y C-terminal para los fragmentos de región media. En sujetos con insuficiencia renal, C-terminal suele presentar resultados elevados de PTH, como se refleja por un aclaramiento renal.

Los ensayos de PTH intacta son importantes para la diferenciación de hiperparatiroidismo primario de otros (no mediada por la paratiroideas), formas de la hipercalcemia como tumores malignos, sarcoidosis y la tirotoxicosis. La medición de la hormona paratiroidea es la forma más específica de hacer el diagnóstico de hiperparatiroidismo primario. En presencia de hipercalcemia, un elevado nivel de hormona paratiroidea prácticamente establece el diagnóstico. En más del 90% de los pacientes con hiperparatiroidismo primario, la hormona paratiroidea se eleva.

La otra causa más común de hipercalcemia, es decir, la hipercalcemia maligna, se asocia con niveles reducidos de la hormona paratiroidea o PTH dentro del rango normal. Cuando el nivel de PTH intacta se compara con los niveles séricos de calcio, la concentración de PTH intacta para los pacientes con hipercalcemia maligna se encuentra casi siempre bajos teniendo en cuenta la elevación del calcio sérico

A diferencia de C-terminal y región media de PTH, que por lo general son sumamente elevados en sujetos con insuficiencia renal, los ensayos de PTH intacta se ven menos afectados por el deterioro de la función renal. Los valores de PTH suelen ser indetectables en hipocalcemia debido al hipoparatiroidismo total, sino que se encuentran dentro del rango normal

de hipocalcemia debido a la pérdida parcial o inhibición de la función paratiroidea

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El immunoensayo para la PTH intacta es un sitio de dos ELISAS para la medición de la cadena biológica intacta de 84 aminoácidos de la PTH. Dos anticuerpos diferentes de cabra policlonal de PTH humanos han sido purificados por cromatografía para ser específicos para las regiones bien definidas en la molécula de PTH. Un anticuerpo es preparado para unirse solo a la zona media de la región C-terminal de la PTH 39-84 y este anticuerpo es biotinilado. El otro anticuerpo es preparado para que se una solamente a N-terminal PTH 1-34 y este anticuerpo es marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la detección.

Aunque los fragmentos de la región media y C-terminal están obligados por la biotina anti-PTH (39-84), sólo la PTH intacta 1-84 forma el complejo de sándwich necesarios para la detección. La capacidad de los anticuerpos con biotina y la estreptavidina recubriendo los micropozos se han ajustado para exhibir interferencias mínimas en fragmentos inactivos, incluso a niveles muy elevados.

En este ensayo, calibradores, controles o las muestras del paciente al mismo tiempo se incuban con el anticuerpo marcado con enzima y un anticuerpo de biotina unida en una microplaca recubierta de estreptavidina. Al final de la incubación del ensayo, los pocillos se lavan para eliminar los componentes no unidos y la enzima ligada a la fase sólida se incuban con el sustrato, tetrametilbencidina (TMB). Una solución ácida se añade para detener la reacción y la convierte en el color a amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de PTH intacta en la muestra. Una curva dosis-respuesta de la unidad de absorbancia frente a la concentración se genera con los resultados obtenidos de los calibradores. Las concentraciones de PTH intacta presentes en los controles y las muestras del paciente se determina directamente a partir de esta curva.

REACTIVOS**Materiales abastecidos con el equipo de prueba:**

1. Tiras de micropozos cubiertos con doble anticuerpo purificado Anti-PTH (12x8)
2. Anticuerpo Biotina Anti-PTH. 1 Frasco
3. Enzima Peroxidasa marcada con Anticuerpos Anti-PTH. 1 Frasco
4. TMB Sustrato cromógeno. 1 Frasco
5. Diluyente de muestras. 1 Frasco
6. Concentrado de lavado. 1 Frasco
7. Solución de reconstitución. 1 Frasco
8. Solución de paro. 1 Frasco
9. 1 Juego de calibradores. 1 vial c/u
10. 1 Juego de controles. 1 vial c/u

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión, 25 µL, 100 µL y 150 µL
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
 Ruyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
 CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

Diagnóstica
 Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Los reactivos incluidos en este kit han sido diseñados a partir de componentes de sangre no humana. Las muestras de pacientes humanos, podrían ser positivas para HBsAG, HbcAG o presentar anticuerpos contra HIV, por lo que deben ser tratados como potencialmente infecciosos de riesgo biológico. Precauciones generales en el manejo, debe ser ejercido, tal como se aplica a cualquier muestra de pacientes no probados.
2. La solución de paro consiste en Ácido sulfúrico 1N. Este es un ácido fuerte. Aunque diluido debe ser manejado con cuidado. Puede causar quemaduras y debe ser manejado con guantes y protección para los ojos, además, con ropa de protección adecuada. Cualquier derrame debe limpiarse inmediatamente con grandes cantidades de agua. No respirar el vapor y evitar la inhalación.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

La determinación de PTH intacta se debe realizar con plasma (EDTA) o suero. El plasma (EDTA) ha demostrado mayor estabilidad de PTH en comparación con el suero. Para el ensayo de la muestra por duplicado, se requieren 50 µl de suero o plasma (EDTA). Tomar la muestra de sangre entera sin anticoagulante o con anticoagulante en tubo lavanda (EDTA). Posteriormente ya que la sangre coagulo (suero), debe ser inmediatamente separados, preferentemente en una centrifuga refrigerada y almacenar a -20°C o inferior. Las muestras de suero se pueden almacenar hasta 8 horas a 2 - 8°C. Las muestras de suero congeladas a -20°C son estables durante un periodo de 4 meses.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS Y ALMACENAMIENTO

1. Todos los reactivos, excepto el calibrador cero, controles y el concentrado de lavado están listos para usar. Almacene todos los reactivos entre 2-8°C, excepto el concentrado del lavado, que debe mantenerse a temperatura ambiente hasta su dilución para evitar la precipitación.
2. Para cada uno de los calibradores diferentes de cero (calibrador B al F) y el kit de controles 1 y 2, reconstituir cada vial con 500 µL del reactivo 4 (solución de reconstitución) y mezclar. Dejar el vial en reposo durante 10 minutos y luego mezclar bien por inversión suave para asegurar la reconstitución completa. Use los calibradores y controles lo antes posible después de la reconstitución. Congele (-20°C) el resto de los calibradores y controles después de su uso. Los estándares y controles son estables a -20°C durante 6 semanas después de su reconstitución con un máximo de 3 ciclos de congelación y descongelación.
3. Reactivo A (concentrado de lavado) Mezcle los contenidos de lavado perfectamente. Si el concentrado de lavado presenta un precipitado debido a un almacenamiento a una baja temperatura como de 4°C, colocar el vial en baño Maria a 37°C hasta disolver el precipitado. Agregar el concentrado de lavado (30 ml) a 570 ml de agua destilada o desionizada y mezclar perfectamente. La solución diluida de trabajo es estable durante 90 días cuando se almacena a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Coloque las tiras suficientes recubiertas de estreptavidina en un soporte para procesar los seis calibradores PTH, (A – F PTH Calibradores), se señala la concentración exacta en la etiqueta. Además de los sueros de los pacientes y controles.
2. Pipetee 25 µL de muestras, controles y calibradores en los pocillos

correspondientes. Congele (-20°C) el resto de calibradores y controles lo antes posible después de su uso.

3. Agregar 50 µL de Reactivo 1 (Anticuerpo biotinilado) en cada uno de los pocillos a procesar.
 4. Agregar 50 µL de Reactivo 2 (Anticuerpos marcados con la enzima) en cada uno de los pocillos a procesar. Cubrir la microplaca con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y colocarla en un agitador orbital a 170 ± 10 rpm por 3 horas ± 30 minutos a temperatura ambiente (22 – 28°C)
 5. Aspirar el líquido completamente, posteriormente lavar/aspirar cada pocillo cinco veces con la solución de lavado de trabajo (preparado a partir del Reactivo A), utilizando un lavador de microplacas automático. El volumen de solución de lavado se debe establecer en 0.35 mL para cada pocillo.
 6. Agregar 150 µL del Reactivo B (TMB) en cada uno de los pocillos.
 7. Cubrir la placa para evitar la exposición a la luz y colocar en un agitador orbital a 170 ± 10 rpm por 30 minutos ± 5 minutos temperatura ambiente (22 – 28°C)
 8. Agregar 100 µL de solución de paro en cada uno de los pocillos. Mezclar suavemente.
 9. Leer la absorbancia de la solución de cada uno de los pocillos en un lapso no mayor a 10 minutos. Utilizando un lector de micro placas a 450 nm utilizando 250 µL de agua destilada o desionizada. Lea la placa de nuevo con un filtro de 405 nm con agua destilada o desionizada.
- Nota:** La segunda lectura está diseñada para extender la validez analítica de la curva de calibración para el valor representado por el calibrador más alto, que es de aproximadamente 700 – 1000 pg/ml. Por lo tanto, las muestras de pacientes con PTH >200 pg/ml se pueden cuantificar con una curva de calibración que consiste en las lecturas de todo el camino hasta la concentración equivalente al calibrador más alto con la lectura de 405 nm, lejos de la longitud de onda máxima de absorción. En general, las muestras de pacientes y controles deben ser leídos con 450 nm para las concentraciones de PTH de hasta 200 pg/ml. Las concentraciones de PTH por encima de 200 pg/ml deberán ser interpolados con la lectura de 405 nm.
10. Utilizando los valores de la absorbancia final del paso anterior, construir una curva de calibración, cubica, logística de 4 parámetros o interpolación de punto a punto para cuantificar la concentración de la PTH intacta.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. De las lecturas obtenidas con el filtro de 450 nm construir una curva dosis-respuesta (curva de calibración) con los primeros cinco calibradores siempre, es decir, Calibradores A, B, C, D y E. Para las lecturas de 405 nm, construir una curva dosis-respuesta utilizando los tres calibradores con las concentraciones más altas, es decir, los Calibradores D, E y F.
2. Asigne la concentración de cada calibrador en el vial en pg/mL. Representar gráficamente los datos de la curva de calibración en papel grafico lineal con la concentración en el eje X y el correspondiente de la absorbancia. en el eje de las Y.
3. Dibujar una línea recta entre dos puntos adyacentes. Este algoritmo matemático se conoce como "punto a punto" de cálculo. Obtener la concentración de la muestra mediante la localización de la unidad de la absorbancia en el eje Y, y encontrar el valor de concentración correspondiente en el eje X. Muestras de los pacientes y el control deben ser leídos con los 450 nm para las concentraciones de PTH hasta 200 pg/mL. Las concentraciones de PTH por encima de 200 pg/mL deberán ser interpoladas con las lecturas de 405 nm.

CONTROL DE CALIDAD

Pools de suero control deben ser analizados con cada ejecución de los calibradores y muestras de pacientes. Los resultados generados a partir del análisis de las muestras de control deben ser evaluados para su aceptación por métodos estadísticos apropiados. En los ensayos en los que uno o más valores de la muestra de control de calidad se encuentren fuera de los límites aceptables, los resultados de la muestra del paciente puede ser no válida.

VALORES ESPERADOS

Los niveles de PTH intacta se midieron en cincuenta y ocho (58) personas de apariencia normal en los EEUU con la prueba ELISA PTH. Los valores obtenidos variaron desde 9.0 hasta 94 pg/mL. Con base en las pruebas estadísticas de la asimetría, la población, cuando se transforma logarítmicamente sigue la distribución normal o de Gauss, como se muestra en los histogramas. La media geométrica + 2 desviaciones estándar de la media se calculan en 10.4 a 66.5 pg/mL.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La PTH ELISA Kit no ha mostrado ningún "efecto gancho" para altas dosis con muestras adicionadas con 2,100,000 pg/mL de PTH intacta. Las muestras con niveles de PTH intacta mayores que el calibrador más alto, se deben diluir y volverse analizar para obtener los valores correctos. Al igual que cualquier anualito utilizado, debe ser utilizado como un complemento para el diagnóstico, resultados de PTH intacta debe ser interpretada cuidadosamente con las presentaciones de clínica general y otras pruebas diagnósticas de apoyo.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

La sensibilidad, o límite de detección, de este ensayo se define como el valor más pequeño o único, que puede distinguirse de cero en el límite de confianza del 95%. La PTH ELISA tiene una sensibilidad calculada de 1.57 pg/mL.

ESPECIFICIDAD Y REACTIVIDAD CRUZADA

1. Los anticuerpos utilizados en la PTH ELISA fueron purificados por cromatografía de afinidad para ser específicos para regiones bien definidas en la molécula de PTH. El anticuerpo marcado con peroxidasa reconoce solo a la región N-terminal o la secuencia 1-34 de aminoácidos de la molécula de PTH, mientras que el anticuerpo biotinilado es específico para el segmento 39-84. En consecuencia, solo PTH Intacta, requiere la unión de ambas (enzima conjugada y anticuerpos con biotina) para ser detectados en el ensayo.
2. A fin de lograr la especificidad de este ensayo, la conjugación, la biotinilación y las relaciones molares de los mismos, se han optimizado para minimizar la detección de fragmentos de la PTH. Humanos con PTH 1-34 en niveles de hasta 300 pg/ml y el C-terminal fragmento 39-84 con niveles de hasta 300,000 pg/ml dan reactividad cruzada molar de PTH inferiores al 2% y 0.02%, respectivamente.

PRECISION Y REPRODUCIBILIDAD

La precisión intra-ensayo de los IID PTH ELISA se calculó a partir de 25 determinaciones repetidas en cada una de las dos muestras.

VARIACIÓN INTRA-ENSAYO			
Muestra	Valor de la Media (pg/mL)	N	Coefficiente de Variación %
A	32.4	25	6.08
B	178.2	25	3.68

La precisión total del inter-ensayo de la prueba de ELISA IID PTH se calculó a partir de los datos en dos muestras obtenidas en 21 ensayos diferentes, por tres técnicos en dos lotes diferentes de reactivos, en un periodo de tres semanas.

VARIACIÓN INTER-ENSAYO			
Muestra	Valor de la Media (pg/mL)	N	Coefficiente de Variación %
A	30.3	21	3.6
B	159.1	21	2.8

REFERENCIAS

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

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA