



Hormona paratiroidea, intacta (PTH) Sistema de pruebas de 2da generación Código de producto: 9025-300

1.0 INTRODUCCIÓN

Uso previsto: Determinación cuantitativa de la concentración de PTH en suero o plasma humano mediante un inmunoensayo enzimático colorimétrico en microplaca.

2.0 RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido compuesto por 84 aminoácidos, vital para la homeostasis del calcio¹ ya que junto con la vitamina D y la calcitonina regula el calcio sérico (Ca²⁺). Secretada por la glándula paratiroidea en respuesta al Ca²⁺ bajo, la PTH estimula la liberación de calcio en la médula ósea, la producción en el intestino y el riñón² y minimiza la excreción urinaria. Mientras tanto, la calcitonina tiene el efecto de aumentar la excreción urinaria y reducir el calcio en sangre cuando el Ca²⁺ está en niveles elevados³.

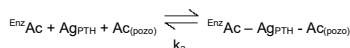
La PTH intacta desaparece rápidamente del torrente sanguíneo con una vida media de menos de cuatro minutos. La detección de niveles elevados de PTH es imprescindible para monitorear el metabolismo óseo, especialmente en presencia de hipercalcemia⁴, lo que prácticamente hace el diagnóstico primario de hiperparatiroidismo, dado que la gran mayoría (>90%) de tales pacientes presentan niveles elevados de PTH. La diferenciación de otras formas de hipercalcemia (no mediada por la paratiroidea), como las neoplasias (la segunda causa más común), la sarcoidosis y la toxicosis tiroidea, se asocia con niveles bajos o normales de hormona paratiroidea (PTH). En los casos de hipocalcemia, los niveles de PTH pueden no ser detectables debido al hipoparatiroidismo total, pero pueden encontrarse en el rango normal en la hipocalcemia debida a la pérdida parcial o a la inhibición de la función paratiroidea. La importancia clínica de la hormona paratiroidea ha aumentado en conjunción con la etiología de la hipocalcemia y la hipercalcemia. Los estudios iniciales revelaron que la hormona paratiroidea es sintetizada como una prohormona seguida de una importante escisión y modificación, constituyendo estos fragmentos la mayor parte de la hormona paratiroidea circulante. Sin embargo, los fragmentos de PTH carecen de actividad biológica, y la PTH intacta (PTH) que abarca los residuos 1-84 es responsable de la regulación del calcio. El segmento N-terminal de la PTH es necesario para el acoplamiento con el receptor, mientras que los residuos C-terminal son responsables de la activación del receptor de la PTH^{5,6}. Así, la separación de la hormona paratiroidea entera de los péptidos fragmentados es integral en el análisis osteometabólico⁷.

3.0 PRINCIPIO

Método Equilibrio tipo Sandwich (TYPE 2):

Los reactivos esenciales necesarios para un ensayo inmunoenzimométrico incluyen anticuerpos de alta afinidad y especificidad (enzimáticos e inmovilizados), con reconocimiento de epítopos claramente diferenciados, **en exceso**, y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización tiene lugar durante el ensayo en la superficie del pozo de la microplaca mediante la interacción con los anticuerpos anti-PTH (epítopo C-terminal) fijados a la superficie del pozo

Al mezclar el anticuerpo marcado con enzimas (epítopo N-terminal) y un suero que contenga el antígeno nativo, se produce una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia ni impedimento estérico, para formar un complejo tipo sándwich. La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



AC_(pozo) = Anticuerpo fijado en el pozo (Cantidad en Exceso)
Ag_{PTH} = Antígeno nativo (cantidad variable)
Enz-AC = Anticuerpo marcado con enzima (cantidad en exceso)
Enz-AC - Ag_{PTH} - AC_(pozo) = Complejo tipo Sandwich Antígeno-Anticuerpos
K_a = Constante de asociación
K_a = constante de disociación

Después de un tiempo suficiente, la fracción unida al anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática en la fracción unida al anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Mediante la utilización de varios sueros de referencia de concentración de antígeno conocida, se puede generar una curva dosis / respuesta a partir de la cual se puede determinar la concentración de un desconocido.

4.0 REACTIVOS

Materiales suministrados:

A. Calibradores PTH - 1.0ml/vial (Liofilizados)- Iconos A-F

Seis (6) viales de sueros de referencias para PTH en concentraciones de 0 (A), 15 (B), 75 (C), 150 (D), 500 (E) y 1000 (F) pg/ml. a 2 - 8°C **Reconstituir cada vial con 1.0ml de agua destilada o desionizada.** Los calibradores reconstituidos son estables durante 24 horas a 2-8 °C. Para almacenarlos durante un periodo más largo, alícuotar los calibradores reconstituidos en viales y almacenarlos a -20 °C. **NO CONGELAR/DESCONGELAR MÁS DE DOS VECES.** Se le ha agregado un conservante.

Nota: Los calibradores, con base en suero humano, son trazables al 1er estándar 95/646 de la OMS.

B. Control PTH - 1.0ml/vial (Liofilizados)- Iconos [M y N]

Dos (2) viales de controles de referencia para PTH. Almacenar a 2-8 °C. **Reconstituir cada vial con 1.0ml de agua destilada o desionizada.** Los controles reconstituidos son estables durante 2 días a 2-8°C. Para almacenar durante un periodo más largo, alícuotar los controles reconstituidos en viales y almacenar a -20°C. **NO CONGELAR/DESCONGELAR MÁS DE DOS VECES.** Se le ha agregado un conservante.

C. Reactivo Enzimático PTH 2^{da} Gen - 6ml/vial - Icono

Un (1) vial contiene reactivo conjugado anti-PTH. Almacenar a 2-8°C.

D. Placa recubierta de Anticuerpo contra PTH - 96 pozos - Icono

Una microplaca de 96 pozos recubierta con anticuerpo contra la PTH. Almacenar a 2-8°C.

E. Solución de lavado concentrada (20x) - 20 ml/vial - Icono

Un (1) vial que contiene un surfactante en una solución salina tamponada. Se le ha agregado un conservante. Almacenar a 2-8 °C. Ver sección de Preparación de Reactivos.

F. Reactivo sustrato - 12 ml/vial - Icono S^N

Un (1) vial que contiene tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en tampón. Almacenar a 2-8°C.

G. Solución de parada - 8 ml/vial - Icono

Un (1) vial que contiene un ácido fuerte (H₂SO₄). Almacenar a 2-8°C.

H. Instrucciones del producto.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: No exponer los reactivos al calor, al sol o a la luz fuerte.

Nota 3: Los componentes anteriores son para una única microplaca de 96 pozos. Para otras configuraciones del kit, véase la tabla al final de este inserto

4.1 Material requerido pero no suministrado:

- Pipeta capaz de dispensar volúmenes de 0.050ml (50µl) y 0.100 ml (100µl) con una precisión superior al 1,5 %.
- Dispensador(es) para entregas repetitivas de volúmenes de 0,100 ml (100µl) y 0,350 ml (0.350µl) con una precisión superior al 1,5 %.
- Lavador de microplacas o botella exprimible (opcional).
- Lector de microplacas con capacidad de medir absorbancias en una longitud de onda de 450 nm y 620 nm.
- Papel absorbente para secar los pozos de la microplaca.
- Envoltura plástica o cubierta de microplacas para los pasos de incubación.
- Aspirador al vacío (opcional) para los pasos de lavado.
- Temperizador.
- Materiales de control de calidad.

5.0 PRECAUCIONES

**Para uso de diagnóstico in vitro
No para uso interno o externo en humanos o animales**

Se ha encontrado que todos los productos que contienen suero humano son no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1 y 2 y del VHC mediante reactivos licenciados por

la FDA. Dado que ninguna prueba conocida puede ofrecer una seguridad absoluta de que no hay agentes infecciosos, todos los productos de suero humano deben manipularse como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Se pueden encontrar buenos procedimientos de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos en el Centro para el Control de Enfermedades/Instituto Nacional de Salud, "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", 2da Edición, 1988, Publicación Núm. de HHS (CDC) 88-8395.

La eliminación segura de los componentes del kit debe realizarse de acuerdo con los requisitos reglamentarios y legales locales.

6.0 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los especímenes serán de sangre tipo suero o plasma con EDTA, y se tomarán con las precauciones usuales en la recolección de muestras por Venopunción. Para una comparación precisa que permita establecer los valores normales, debe obtenerse una muestra de suero matutino en ayunas. La sangre debe recogerse en un tubo de venopunción simple de tapa roja sin aditivos ni anticoagulantes para el suero o tubos con EDTA para plasma. Permitir que la sangre se coagule y Centrifugar la muestra para separar el suero o plasma de las células.

Si la(s) muestra(s) no puede(n) ser analizada(s) inmediatamente después de la extracción de sangre, la(s) muestra(s) puede(n) ser almacenada(s) a temperaturas de -20 °C hasta 30 días. Evite el uso de dispositivos contaminados. Evitar la congelación y descongelación repetidas (un máximo de dos ciclos de congelación/descongelación antes de su uso). Cuando se analiza por duplicado, se requieren 0.100 ml (100 µl) de la muestra.

7.0 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe ensayar controles con niveles en los rangos bajo, medio y alto de la curva dosis-respuesta para monitorear el desempeño del ensayo. Estos controles deben tratarse como desconocidos y los valores deben determinarse en cada procedimiento de prueba realizado. Se deben mantener gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Deben emplearse los métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Una desviación significativa a partir de los datos establecidos de desempeño puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben utilizar reactivos nuevos para determinar el motivo de las variaciones.

8.0 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Buffer de lavado**
Diluir el contenido de la solución de lavado hasta 1000 ml con agua destilada o desionizada en un recipiente de almacenamiento adecuado. El buffer diluido puede almacenarse a 2-30 °C durante un máximo de 60 días.

Nota: No utilizar reactivos contaminados o con proliferación bacteriana.

9.0 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes de proceder al ensayo, llevar todos los reactivos, Sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20-27°C).

****El procedimiento de la prueba debe ser realizado por una persona capacitada o un profesional entrenado.**

- Formatear los pozos de la microplaca para cada suero de referencia, control y muestra de paciente a ensayar por duplicado. **Vuelva a colocar las tiras de microplaca que no haya utilizado en la bolsa de aluminio, séllela y guárdela a 2-8°C.**
- Pipetear 0,050 ml (50µl) del suero de referencia apropiado, control o muestra dentro del pozo asignado.
- Añadir 0,050 ml (50 µl) del reactivo enzimático PTH a cada pozo. **Es muy importante dispensar todos los reactivos cerca del fondo del pozo.**
- Agitar suavemente la microplaca durante 20-30 segundos, cubrir e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Deshechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, secar la placa con papel absorbente.
- Añadir 0,350 ml (350 µl) de buffer de lavado (véase la sección de preparación de reactivos), decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir dos (2) veces más para un total de tres (3) lavados. **Se puede utilizar un lavador de placas automático o manual. Siga las instrucciones del fabricante para un uso adecuado. Si se emplea una botella exprimible, llene cada pocillo presionando el recipiente (evitando las burbujas de aire) para dispensar el lavado. Decantar solución de lavado y repetir dos (2) veces más.**
- Añadir 0,100 ml (100 µl) de sustrato de TMB a todos los pozos (véase la sección de preparación de reactivos). **Añada siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre los pocillos.**

NO AGITAR LA PLACA DESPUÉS DE LA ADICIÓN DEL SUSTRATO

- Incubar a temperatura ambiente durante veinte (20) minutos.
- Añadir 0,050 ml (50 µl) de solución de parada a cada pozo y mezclar suavemente durante 15-20 segundos. **Añada siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre los pocillos.**
- Leer la absorbancia en cada pozo a 450nm (utilizando una longitud de onda de referencia de 630nm para minimizar las imperfecciones del pozo) en un lector de microplacas. **Los resultados deben leerse en los quince (15) minutos siguientes a la adición de la solución de parada.**

Nota 1: Para reanalizar muestras con concentraciones superiores a 1000 pg/ml, la dilución debe realizarse en suero o plasma humano con valores bajos de PTH y multiplicarse en consecuencia.

Nota 3: La mezcla cíclica (arranque y parada) durante 5-8 segundos/ciclo (4 ciclos) es más eficaz que un ciclo continuo (20-30 segundos) para lograr la homogeneidad. Se puede utilizar un mezclador de placas para realizar los ciclos de mezcla.

Nota 4: Es extremadamente importante dispensar con precisión el volumen correcto con una pipeta calibrada y añadiendo cerca del fondo de los pozos en ángulo mientras se toca el lado del pozo.

10.0 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

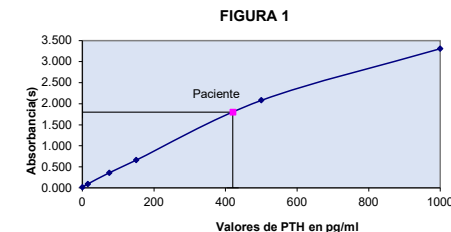
Se utiliza una curva dosis-respuesta para determinar la concentración de PTH en muestras desconocidas.

- Trazar la absorbancia de cada duplicado del suero de referencia frente a la correspondiente concentración de PTH en pg/ml en papel de gráfico lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de trazarlos).
- Dibuje la curva con mejor ajuste a través de los puntos trazados.
- Para determinar la concentración de PTH de un desconocido, localice la absorbancia media de los duplicados de cada desconocido en el eje vertical del gráfico, encuentre el punto de intersección de la curva y lea la concentración (en pg/ml) en el eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido pueden promediarse como se indica). En el siguiente ejemplo, la absorbancia media (1,800) se cruza con la curva dosis-respuesta a 419 pg/ml de concentración de PTH (Ver Figura 1).

Nota: Para la reducción de datos también se puede utilizar un software de reducción de datos diseñado para ensayos ELISA. **Si se utiliza este tipo de software, debe comprobarse la validación del mismo.**

EJEMPLO 1				
Muestra I.D.	Pozo Número	Abs (A)	media Abs (B)	Valor (pg/ml)
Cal A	A1	0.013	0.015	0
	B1	0.017		
Cal B	C1	0.082	0.091	15
	D1	0.106		
Cal C	E1	0.370	0.357	75
	F1	0.355		
Cal D	G1	0.677	0.657	150
	H1	0.647		
Cal E	A2	2.103	2.079	500
	B2	2.065		
Cal F	C2	3.265	3.308	1000
	D2	3.360		
Paciente	E2	1.801	1.800	419
	F2	1.800		

* Los datos presentados en el Ejemplo 1 y en la Figura 1 son sólo ilustrativos y no deben utilizarse en lugar de una curva estándar preparada con cada ensayo.



*Si la lectura de la absorbancia está fuera de escala o es superior a la absorbancia media del calibrador más alto, la muestra debe repetirse con dilución.

11.0 PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, deben cumplirse los siguientes criterios:

1. Absorbancia máxima del Calibrador 'F' debe ser $\geq 1,3$
2. Cuatro de los seis pools de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

12.0 ANÁLISIS DE RIESGO

La hoja de datos de seguridad y el formulario de análisis de riesgos de este producto están disponibles solicitándolos a Monobind Inc.

12.1 Desempeño del análisis

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
2. El pipeteo de las muestras no debe extenderse más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del ensayo.
3. No deben utilizarse muestras altamente lipémicas, hemolizadas o muy contaminadas.
4. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta.
5. La adición de la solución de sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada con la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato y la solución de parada deben añadirse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
6. Los lectores de placas miden verticalmente. No tocar el fondo de los pozos.
7. Si no se elimina adecuadamente la solución adherida en la(s) etapa(s) de lavado por aspiración o decantación, puede resultar en una replicación deficiente y en resultados incorrectos.
8. Utilice componentes del mismo lote. No se deben mezclar reactivos de diferentes lotes.
9. Es esencial un pipeteo exacto y preciso, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura prescritos. Cualquier desviación del inserto de Monobind puede producir resultados inexactos.
10. Todas las normas, reglamentos y leyes nacionales aplicables, incluidos, entre otros, los buenos procedimientos de laboratorio deben seguirse estrictamente para garantizar el cumplimiento y el uso adecuado del dispositivo.
11. Es importante calibrar todo el equipo, por ejemplo, las pipetas, los lectores, los lavadores y/o los instrumentos automatizados utilizados con este dispositivo, y realizar un mantenimiento preventivo de rutinario.
12. El Análisis de Riesgos, tal y como lo exige la Directiva 98/79/EC CE Mark IVD, para este y otros dispositivos fabricados por Monobind, puede solicitarse por correo electrónico a Monobind@monobind.com.

12.2 Interpretación

1. Las mediciones y la interpretación de los resultados deben ser realizadas por una persona capacitada o un profesional entrenado.
2. Los resultados de laboratorio son sólo un aspecto para determinar el cuidado del paciente y no deben ser la única base para la terapia, particularmente si los resultados entran en conflicto con otros determinantes.
3. Para que los resultados de la prueba sean válidos, los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos listados y los requisitos del ensayo.
4. Si los kits de pruebas son alterados, por ejemplo, mezclando partes de diferentes kits, lo que podría producir resultados erróneos de las pruebas, o si los resultados son interpretados incorrectamente, Monobind no tendrá ninguna responsabilidad.
5. Si se utiliza la reducción de datos por ordenador para interpretar los resultados de la prueba, es imprescindible que los valores previstos para los calibradores estén dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
6. Los reactivos para el procedimiento del ELISA AccuBind® han sido formulados para eliminar la máxima interferencia; sin embargo, la interacción potencial entre especímenes de suero raros y reactivos de prueba puede causar resultados erróneos. Los anticuerpos heterofílicos suelen causar estas interacciones y es sabido que son un problema para todo tipo de inmunoensayos. (Boscato LM Stuart MC. 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays' Clin. Chem 1988: 3427-33). Para fines de diagnóstico, los resultados de este ensayo deben utilizarse en combinación el examen clínico, el historial del paciente y , todos los demás hallazgos clínicos.

13.0 RANGOS DE VALORES ESPERADOS

Se midieron los niveles de PTH intacta en cincuenta y ocho (58) individuos aparentemente normales. Los valores obtenidos oscilaron entre 9,0 y 94 pg/ml. Según las pruebas estadísticas sobre la asimetría y la curtosis, la población, cuando se transforma logarítmicamente, sigue la distribución normal o gaussiana, como se muestra en los histogramas.

Se calculó que la media geométrica \pm 2 desviaciones estándar de la media era de 10,4 a 66,5 pg/ml.

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un rango de valores, que se puede esperar encontrar por un método dado para una población de personas "normales", depende de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población analizada y la precisión del método en manos del analista. Por estas razones, cada laboratorio debe depender del rango de valores esperados establecido por el fabricante sólo hasta que los analistas que utilizan el método puedan determinar un rango propio con una población autóctona de la zona en la que se encuentra el laboratorio.

14.0 ESPECIFICIDAD

Se ensayaron los siguientes fragmentos de PTH y se comprobó que no eran reactivos.

Péptido	Conc (pg/ml)	% Reactividad
Fragmento 1-34	100.000	0.001
Fragmento 1-44	100.000	0.005
Fragmento 7-34	100.000	0.002

15.0 REFERENCIAS

1. Mundy, G.R.; Guise, T.A. Hormonal Control of Calcium Homeostasis. *Clinical Chemistry* 1999, 45, 8, 1347-1352.
2. Mannstadt, M.; Bilezikian, J.P.; Thakker, R.V.; Hannan, F.M.; Clarke, B.L.; Rejnmark, L.; Mitchell, D.M.; Vokes, T.J.; Winer, K.K.; Shoback, D.M. Hypoparathyroidism. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3, 17055, 1-20.
3. Potts, J.T. Parathyroid hormone: past and present. *Journal of Endocrinology* 2005, 187, 311-325.
4. Lepage, R.; Roy, L.; Brossard, J.-H.; Rousseau, L.; Dorais, C.; Lazure, C.; D'Amour, P. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clinical Chemistry* 1998, 44, 4, 805-809.
5. Jin, R.; Briggs, S.L.; Chandrasekhar, S.; Chirgadz, N.Y.; Clawson, D.K.; Schevitz, R.W.; Smiley, D.L.; Tashjian, A.H.; Zhang, F. Crystal Structure of Human Parathyroid Hormone 1-34 at 0.9-Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 35, 27238-27244.
6. Shimizu, M.; Shimizu, N.; Tsang, J.C.; Petroni, B.D.; Khatri, A.; Potts Jr., J.T.; Gardella, T.J. Residue 19 of the Parathyroid Hormone (PTH) Modulates Ligand Interaction with the Juxtamembrane Region of the PTH-1 Receptor. *Biochemistry* 2002, 41, 13224-13233.
7. Brossard, J.H.; Cloutier, M.; Roy, L.; Lepage, R.; Gascon-Barre, M.; D'Amour, P. Accumulation of a Non-(1-84) Molecular Form of Parathyroid Hormone (PTH) Detected by Intact PTH Assay in Renal Failure: Importance in the Interpretation of PTH Values. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81, 11, 3923-3929.

Fecha efectiva: 2022-ene-30 Rev. 3 DCO: 1543
MP9025 Código de producto: 9025-300

Tamaño	96(A)	192(B)	
Reactivo	A)	juego de 1.0ml	juego de 1.0ml
	B)	juego de 1.0ml	juego de 1.0ml
	C)	1 (6ml)	2 (6ml)
	D)	1 placas	2 placas
	E)	1 (20ml)	1 (20ml)
	F)	1 (12ml)	2 (12ml)
	G)	1 (8ml)	2 (8ml)

Para pedidos o consultas, póngase en contacto con



Tel: +1 949.951.2665 Mail: info@monobind.com
Fax: +1 949.951.3539 Fax: www.monobind.com



CE
CEpartner4U, Esdoornlaan 13
3951 DBMaarn, The Netherlands
www.cepartner4u.eu

Visite nuestro sitio web para obtener más información sobre nuestros productos y servicios

Glosario de Símbolos (EN 980/ISO 15223)



Dispositivo médico de diagnóstico In vitro



Rango de temperaturas para las condiciones de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Número de catálogo



Contiene suficientes pruebas para



Número de lote



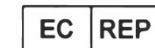
Fecha de vencimiento



Fecha de fabricación



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Conformidad europea