

PTH Intacta (Hormona Paratiroidea) ELISA

No. de Producto PT311T (96 Pruebas)

USO INDICADO

El kit de PTH Intacta ELISA está destinado a la determinación cuantitativa de la PTH intacta (hormona paratiroidea) en suero o plasma humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La PTH (Hormona paratiroidea) es biosintetizada en la glándula paratiroidea como una hormona pre-proparatiroidea, un gran precursor molecular que consiste en 115 aminoácidos. Después de dos pasos de escisión proteolítica intracelular, la glándula paratiroidea secreta la forma activa final que consiste en un péptido de 84 aminoácidos. En individuos sanos, la regulación de la secreción de hormona paratiroidea normalmente ocurre a través de una acción de retroalimentación negativa de calcio sérico en las glándulas paratiroideas. La PTH Intacta es biológicamente activa y se desprende muy rápidamente de la circulación con una vida media de menos de cuatro minutos. Los ensayos de PTH intacta son importantes para la diferenciación del hiperparatiroidismo primario de otras formas de hipercalcemia (no mediadas por los paratiroideos), como la neoplasia maligna, la sarcoidosis y la tirotoxicosis. La medición de la hormona paratiroidea es la forma más específica de hacer el diagnóstico del hiperparatiroidismo primario. En presencia de hipercalcemia, un nivel elevado de hormona paratiroidea prácticamente establece el diagnóstico. En más del 90% de los pacientes con hiperparatiroidismo primario, la hormona paratiroidea será elevada. La otra causa más común de hipercalcemia, la hipercalcemia de neoplasia maligna, se asocia con niveles suprimidos de hormona paratiroidea o niveles de PTH dentro del rango normal. Los valores de PTH son típicamente indetectables en hipocalcemia debido al hipoparatiroidismo total, pero se encuentran dentro del rango normal en hipocalcemia debido a la pérdida parcial o inhibición de la función paratiroidea.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El inmunoensayo de PTH es una prueba ELISA de tipo sándwich adaptada de dos sitios. En este ensayo, los estándares y las muestras de los pacientes se incuban simultáneamente con el anticuerpo de detección etiquetado en enzimas y un anticuerpo de captura acoplado de biotina en un pozo de microplacas recubierto de estreptavidina. Al final de la incubación del ensayo, los micropocillos se lavan para eliminar los componentes no enlazados y la enzima unida a la fase sólida se incubaba con el sustrato, la tetrametilbenzidina (TMB). A continuación, se añade una solución de stop ácida para detener la reacción y convierte el color en amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de PTH intacta en la muestra. Los estándares se utilizan para generar una curva de respuesta de dosis de unidad de absorbancia frente a la concentración. Las concentraciones de PTH intacta presentes en los controles y muestras de pacientes se determinan directamente a partir de esta curva.

MATERIAL PROVIDED	96 TESTS
1. Micropocillos recubiertos con Estreptavidina	12x8x1
2. Estándar PTH 6: 1 Vial (liofilizado)	0.75 ml
3. Controles PTH: 2 Viales (liofilizados)	0.75ml
4. Reactivo anti-PTH-Biotina: 1 botella (lista para usar)	7 ml
5. Conjugado enzimático Anti-PTH-HRP: 1 Botella (Listo para usar)	7 ml
6. Diluyente de ensayo: 1 botella (lista para usar)	5 ml
6. Sustrato TMB: 1 botella (lista para usar)	12 ml
7. Solución Stop: 1 Botella (Listo para usar)	12 ml
8. Solución de lavado 20X: 1 botella	25 ml

MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada
2. Pipetas de precisión
3. Puntas de pipeta desechables
4. Lector ELISA capaz de leer la absorbancia a 450 nm
5. Papel de absorción o toalla de papel
6. Papel gráfico

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Conservar el kit a 2-8°C.
2. Mantenga los micropocillos sellados en una bolsa seca con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta la expiración del kit.
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, al sol o a la luz fuerte.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Este kit de prueba está destinado a la cuantificación de PTH en suero humano o plasma.
2. Posibles materiales biológicos peligrosos:
El calibrador y los controles contienen componentes de origen humano, que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, no existe un método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes. Estos reactivos deben tratarse con el nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda en el manual de los Centros para el Control y la Salud de enfermedades, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos." 1984.
3. Los resultados óptimos se obtendrán mediante una estricta adhesión al protocolo de prueba. Es esencial pipetear con precisión, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura.
4. No pipetee por vía oral. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se manipulan muestras o reactivos del kit.
5. Los componentes de este kit están diseñados para su uso como unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
6. Se recomienda que las muestras de suero se ejecuten por duplicado.

MANEJO Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recoger muestras de sangre y separar el suero inmediatamente.
2. Las muestras deben almacenarse congeladas a (-20°C) hasta un máximo de un mes.
3. Evitar varios ciclos de congelación y descongelación.
4. Antes del ensayo, los sueros congelados deben descongelarse y mezclarse bien.
5. No utilizar muestras altamente lipémicas.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Estándares: Reconstituir los estándares liofilizados con 0,75 ml de agua destilada o desionizada. Dejar que permanezca intacto hasta que se disuelva por completo, y luego mezclar bien con inversiones suaves (no espumar), preparar el resto del set estándar (5-2) con la dilución en serie triple del estándar #6, como se prescribe en la tabla de abajo: (Mezclar cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia.).

Es. No.	Conc. Estándar (pg/mL)	Volumen Estándar
6	900	Reconstituir con 0.75 ml de agua DI
5	300	0.25 ml de Est. 6 más 0.5ml de diluyente de ensayo
4	100	0.25 ml de Est. 5 más 0.5ml de diluyente de ensayo
3	33.3	0.25 ml de Est. 4 más 0.5ml de diluyente de ensayo
2	11.1	0.25 ml de Est. 3 más 0.5ml de diluyente de ensayo
1	0	Sólo diluyente de ensayo

Controles: Reconstituir los controles liofilizados con 0.75ml de agua destilada o desionizada. Permitir que permanezcan intactos hasta que se disuelvan por completo, y luego mezclar bien con una inversión suave.

Utilizar el set estándar y los controles tan pronto como sea posible en el momento de la reconstitución. Congelar el set estándar restante y los controles inmediatamente después de su uso.

Búfer de Lavado: Preparar 1X Búfer de lavado añadiendo el contenido de la botella (25 ml, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conservar a temperatura ambiente (20-25°C).

Las muestras de pacientes con valores superiores al calibrador más alto (estándar 6), que es aproximadamente de 700–1000pg/ml (ver concentración exacta en la etiqueta del vial), pueden diluirse con diluyente de ensayo y volverse a ensayar. Multiplicar el resultado por el factor de dilución.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Permitir que los materiales y reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Colocar el número deseado de tiras en el soporte de la placa.
3. Pipetear 25µl de estándares, controles y muestras en los pozos designados.
4. Añadir 50µl de reactivo anti-PTH-Biotina a todos los pozos.
5. Añadir 50µl de conjugado anti-PTH-HRP a todos los pozos.

- Cubrir el plato e incubar a temperatura ambiente durante 90 minutos en un agitador (500 - 600rpm).
- Retirar el líquido de todos los pozos. Lave los pozos 4 veces con 300µl de 1X búfer de lavado. Secar en toallas de papel absorbente.
- Añadir 100µl de sustrato de TMB a todos los pozos.
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 50µl de solución de Stop a todos los pozos. Mezclar suavemente.
- Leer la absorbancia en el lector ELISA a 450 nm en 15 minutos después de agregar la solución de stop. Utilizar 630nm como referencia.

CÁLCULO DE RESULTADOS

- Asignar la concentración para cada estándar indicado en el vial en pg/ml. Trazar los datos de la curva estándar en papel gráfico lineal con la concentración en el eje X y la A.U. correspondiente en el eje Y.
- Dibujar una línea recta entre 2 puntos adyacentes. Este algoritmo matemático se conoce comúnmente como el cálculo "punto a punto". Obtenga la concentración de la muestra localizando la unidad de absorbancia en el eje Y y encontrando el valor de concentración correspondiente en el eje X.

Ejemplo de una curva estándar

	Conc. (pg/ml)	OD 450nm
Estándar 1	0	0.029
Estándar 2	11.1	0.082
Estándar 3	33.3	0.178
Estándar 4	100	0.459
Estándar 5	300	1.078
Estándar 6	900	2.535

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- No utilizar azida sódica como conservante. La azida sódica inhibe las actividades enzimáticas de HRP.
- El kit PTH ELISA no ha mostrado ningún "efecto de gancho de alta dosis" con muestras con adiciones de alta dosis. Sin embargo, las muestras con niveles de PTH intactas mayores que el calibrador más alto deben diluirse y volver a ensayarse para obtener el valor correcto.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 18 sueros fueron probados por este ELISA y un kit ELISA de referencia. Los resultados fueron los siguientes:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.996	1.0124	2.7005

Precisión

Intra-Ensayo

Suero	No. de réplicas	Media pg/mL	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
1	16	51.8	3.29	6.3%
2	16	244	9.33	3.8%

Inter-ensayo

Suero	No. de réplicas	Media pg/mL	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
1	16	19.6	1.61	8.2%
2	16	56.9	3.88	6.8%
3	16	136	9.1	6.7%

Sensibilidad

La sensibilidad se determinó calculando la media más 2DE del punto cero estándar probado 20 veces en la misma ejecución.

Suero	No. de réplicas	Media pg/mL	Desviación Estándar	Media + 2DE (Sensibilidad)
Estándar Cero	20	0.1	0.194	0.49

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales basados en un muestreo representativo de la población local. El siguiente rango normal para PTH solo se puede utilizar como pauta inicial: 10-65pg/ml⁷

REFERENCIAS

- 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.

2018-04-20