

Instructions for Use

PTH intact ELISA



REF EIA-5953



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	MATERIAL PROVIDED.....	2
4	MATERIALS NOT PROVIDED.....	2
5	STORAGE AND STABILITY	2
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
7	SPECIMEN COLLECTION HANDLING	3
8	REAGENT PREPARATION	3
9	ASSAY PROCEDURE	3
10	CALCULATION OF RESULTS.....	4
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	4
12	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	5
13	EXPECTED VALUES.....	5
1	VERWENDUNGSZWECK.....	6
2	TESTPRINZIP	6
3	BESTANDTEILE DES KITS	6
4	ERFORDERLICHE ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN.....	6
5	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	6
6	WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	7
7	PROBENVORBEREITUNG	7
8	REAGENZENVORBEREITUNG	7
9	TESTDURCHFÜHRUNG	7
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	8
11	GRENZEN DES TESTS.....	8
12	ASSAY-CHARACTERISTIKA.....	8
13	ERWARTETE WERTE.....	8
14	REFERENCES / LITERATURE.....	9
	SYMBOLS USED	10

1 INTENDED USE

The PTH intact ELISA Kit is intended for the quantitative determination of Intact PTH (Parathyroid Hormone) in human serum or plasma (EDTA and heparin plasma).

1.1 Summary and Explanation

PTH (Parathyroid hormone) is biosynthesized in the parathyroid gland as a pre-proparathyroid hormone, a large molecular precursor consisting of 115 amino acids. After two intra-cellular proteolytic cleavage steps, the parathyroid gland secretes the final active form consisting of an 84 amino acid peptide. In healthy individuals, regulation of parathyroid hormone secretion normally occurs via a negative feedback action of serum calcium on the parathyroid glands. Intact PTH is biologically active and clears very rapidly from the circulation with a half-life of less than four minutes. Intact PTH assays are important for the differentiation of primary hyperparathyroidism from other (non-parathyroid-mediated) forms of hypercalcemia, such as malignancy, sarcoidosis and thyrotoxicosis. The measurement of parathyroid hormone is the most specific way of making the Diagnosis of primary hyperparathyroidism. In the presence of hypercalcemia, an elevated level of parathyroid hormone virtually establishes the diagnosis. In over 90% of patients with primary hyperparathyroidism, the parathyroid hormone will be elevated. The most common other cause of hypercalcemia, namely hypercalcemia of malignancy, is associated with suppressed levels of parathyroid hormone or PTH levels within the normal range. PTH values are typically undetectable in hypocalcemia due to total hypoparathyroidism, but are found within the normal range in hypocalcemia due to partial loss or inhibition of parathyroid function.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The PTH intact ELISA is an adapted two-site sandwich ELISA.

In this assay, standards and patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled detection antibody and a biotin coupled capture antibody in a streptavidin-coated microplate well. At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of intact PTH in the sample.

Standards are used to generate a dose response curve of absorbance unit vs. concentration. Concentrations of intact PTH present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

3 MATERIAL PROVIDED

for 96 tests

1. Microwells coated with Streptavidin	12 x 8 x 1 wells	
2. PTH Standards:	6 Vials (Ready to use)	0.5 mL
3. PTH Controls:	2 Vials (Ready to use)	0.5 mL
4. Anti-PTH-Biotin Reagent:	1 Bottle (Ready to use)	7 mL
5. Anti-PTH-HRP Enzyme Conjugate:	1 Bottle (Ready to use)	7 mL
6. TMB Substrate:	1 Bottle (Ready to use)	12 mL
7. Stop Solution:	1 Bottle (Ready to use)	12 mL
8. 20X Wash Solution:	1 Bottle	25 mL

4 MATERIALS NOT PROVIDED

1. Distilled or deionized water
2. Precision pipettes
3. Disposable pipette tips
4. ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm
5. Absorbance paper or paper towel
6. Graph paper

5 STORAGE AND STABILITY

1. Store the kit at 2 °C - 8 °C
2. Keep microwells sealed in a dry bag with desiccants.
3. The reagents are stable until expiration of the kit.
4. Do not expose reagents to heat, sun, or strong light.

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Potential biohazardous materials:
The calibrators contain human source components which have been tested and found non-reactive for hepatitis B surface antigen as well as HIV antibody with FDA licensed reagents. However, as there is no test method that can offer complete assurance that HIV, Hepatitis B virus or other infectious agents are absent, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2, as recommended in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories." 1984
2. This test kit is intended for the quantitation of PTH in human serum or plasma (EDTA and heparin plasma).
3. Do not pipette by mouth. Do not smoke, eat, or drink in the areas in which specimens or kit reagents are handled.
4. The components in this kit are intended for use as an integral unit. The components of different lots should not be mixed.
5. It is recommended that serum samples be run in duplicate.
6. Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Accurate and precise pipetting, as well as following the exact time and temperature requirements prescribed are essential. Any deviation from this may yield invalid data.

7 SPECIMEN COLLECTION HANDLING

1. Collect blood specimens and separate the serum immediately.
2. Specimens may be stored refrigerated at (2 °C - 8 °C) for 5 days.
If storage time exceeds 5 days, store frozen at (-20 °C) for up to one month.
3. Avoid multiple freeze-thaw cycles.
4. Prior to assay, frozen sera should be completely thawed and mixed well.
5. Do not use grossly lipemic specimens.

8 REAGENT PREPARATION

Prepare 1X Wash buffer by adding the contents of the bottle (25 mL, 20X) to 475 mL of distilled or deionized water. Store at room temperature (20 °C - 25 °C).

9 ASSAY PROCEDURE

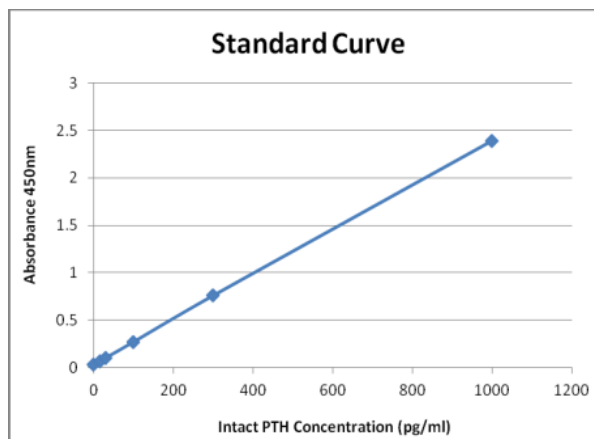
1. Allow materials and reagents to reach room temperature.
2. Place the desired number of strips in the plate holder.
3. Pipet **25 µL** of standards, controls, and samples into the designated wells.
4. Add **50 µL** of anti-PTH-Biotin Reagent to all wells.
5. Add **50 µL** of anti-PTH-HRP Conjugate to all wells
6. Cover the plate and incubate at room temperature for 90 minutes on a plate shaker (500 - 600 rpm).
7. Remove liquid from all wells.
Wash wells **4 times** with **300 µL** of 1X wash buffer. Blot on absorbent paper towels.
8. Add **100 µL** of TMB Substrate to all wells.
9. Incubate for 15 minutes at room temperature.
10. Add **50 µL** of Stop Solution to all wells. Mix gently.
11. Read absorbance on ELISA Reader at 450 nm within 15 minutes after adding the stopping solution. Use 630 nm as a reference.

10 CALCULATION OF RESULTS

1. Assign the concentration for each standard stated on the vial in pg/mL. Plot the data from the standard curve on linear graph paper with the concentration on the X-axis and the corresponding A.U. on the Y-axis.
2. Draw a straight line between 2 adjacent points. This mathematical algorithm is commonly known as the "point-to-point" calculation. Obtain the concentration of the sample by locating the absorbance unit on the Y-axis and finding the corresponding concentration value on the X-axis.

Example of a Standard Curve

	Conc. pg/mL	OD 450 nm
Standard 1	0	0.032
Standard 2	15	0.066
Standard 3	30	0.102
Standard 4	100	0.270
Standard 5	300	0.759
Standard 6	1000	2.392



11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Do not use sodium azide as preservative. Sodium azide inhibits HRP enzyme activities.

The PTH ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" with high dose spiked samples. However, samples with intact PTH levels greater than the highest calibrator, should be diluted the 0 pg/mL standard and reassayed for correct values.

(Additional 0 pg/mL Standard for sample dilution is available upon request.)

12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1 Correlation with a Reference ELISA kit

A total of 110 sera were tested by this ELISA and a reference ELISA kit. Results were as follows:

Correlation	Slope	Intercept
0.996	1.0124	2.7005

12.2 Precision

Intra-Assay

Serum	No. of Replicates	Mean pg/mL	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
1	16	51.8	3.29	6.3%
2	16	244	9.33	3.8%

Inter-assay

Serum	No. of Replicates	Mean pg/mL	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
1	16	19.6	1.61	8.2%
2	16	56.9	3.88	6.8%
3	16	136	9.1	6.7%

12.3 Sensitivity

The sensitivity was determined by calculating the mean plus 2SD of the standard zero point tested 20 times in the same run.

Serum	No. of Replicates	Mean pg/mL	Standard Deviation	Mean + 2SD (Sensitivity)
Zero standard	20	0.1	0.194	0.49

13 EXPECTED VALUES

It is recommended that each laboratory establish its own normal ranges based on a representative sampling of the local population.

The following normal range for PTH (US adult patients) may be used as initial guideline only: 10 - 65 pg/mL [7]

1 VERWENDUNGSZWECK

Der PTH intact ELISA wird zur quantitativen Bestimmung von PTH (Parathormon) in humanem Serum oder Plasma (EDTA- und Heparinplasma) eingesetzt.

2 TESTPRINZIP

Der PTH intact ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert.

Die Mikrotiterplatte ist mit Streptavidin beschichtet. Standards und Patientenproben werden in dieser beschichteten Platte zusammen inkubiert mit einem Enzym-markierten Detektionsantikörper und einem Biotin-markierten Fangantikörper.

Nach Ende der Inkubationszeit werden ungebundene Komponenten durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Das an die Festphase gebundene Enzym wird mit einem TMB-Substrat inkubiert. Durch Zugabe der Stopplösung wird die Farbentwicklung gestoppt. Die Intensität der gebildeten gelben Farbe ist direkt proportional der intakten PTH-Konzentration in der Probe.

Mit Hilfe der Standards wird eine Standardkurve erzeugt, dabei wird die Absorption gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen. Die Konzentration des intakten PTH in Kontrollen und Patientenproben kann direkt aus dieser Kurve ermittelt werden.

3 BESTANDTEILE DES KITS

für 96 Bestimmungen

1. Microwells coated with Streptavidin	12 x 8 x 1 Wells	
2. PTH Standards:	6 Fläschchen (gebrauchsfertig)	0,5 mL
3. PTH Controls:	2 Fläschchen (gebrauchsfertig)	0,5 mL
4. Anti-PTH-Biotin Reagent:	1 Fläschchen (gebrauchsfertig)	7 mL
5. Anti-PTH-HRP Enzyme Conjugate:	1 Fläschchen (gebrauchsfertig)	7 mL
6. TMB Substrate:	1 Fläschchen (gebrauchsfertig)	12 mL
7. Stop Solution:	1 Fläschchen (gebrauchsfertig)	12 mL
8. 20X Wash Solution:	1 Fläschchen	25 mL

4 ERFORDERLICHE ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
2. Kalibrierte Präzisions-Mikropipetten
3. Einweg-Pipettenspitzen
4. Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 nm Filter
5. Saugfähiges Papier
6. Millimeterpapier

5 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

1. Der Testkit muss bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.
2. Die Mikrotiterstreifen müssen verschlossen in einem Folienbeutel mit Trockenmittel aufbewahrt werden.
3. Die Reagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum des Kits stabil.
4. Die Reagenzien dürfen weder Hitze, Sonne noch starkem Licht ausgesetzt werden.

6 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Potenziell biologisch gefährliches Material:
Die Kalibratoren enthalten humanes Material. Dies wurde getestet und negativ befundet für HBsAg, und HIV. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
2. Dieser Test ist für die quantitative Bestimmung von PTH in Humanserum und -plasma (EDTA- und Heparinplasma).
3. Nicht mit dem Mund pipettieren. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden
4. Die Komponenten dieses Kits sind eine integrale Einheit. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen.
5. Es wird empfohlen, die Messung in Doppelbestimmung durchzuführen
6. Bei genauer Beachtung dieses Protokolls werden optimale Ergebnisse erzielt. Exaktes Pipettieren und die Einhaltung der angegebenen Zeit und der Temperatur sind erforderlich. Jede Abweichung vom angegebenen Protokoll kann zu ungünstigen Ergebnissen führen.

7 PROBENVORBEREITUNG

1. Blutproben entnehmen und Serum sofort abtrennen.
2. Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung können die Proben eingefroren bei -20 °C bis zu einem Monat gelagert werden.
3. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen vermeiden.
4. Vor Testbeginn müssen gefrorene Proben vollständig aufgetaut sein und vorsichtig durchmischt werden.
5. Stark lipämische Proben sollen nicht verwendet werden.

8 REAGENZIVORBEREITUNG

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung (Wash Solution, 25 mL) mit 475 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung kann bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) gelagert werden.

9 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Alle benötigten Materialien und Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
2. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
3. **Je 25 µL** Standard, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
4. **50 µL** Anti-PTH-Biotin Reagenz in jedes Well geben.
5. **50 µL** Anti-PTH-HRP Konjugat in jedes Well geben.
6. Platte abdecken und 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 500 - 600 Upm inkubieren.
7. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4-mal** mit **300 µL** verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100 µL** TMB-Substrate in jedes Well geben.
9. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
10. **50 µL** Stopplösung in jedes Well geben. Vorsichtig mischen.
11. Die Optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen. 630 nm als Referenzwellenlänge verwenden.

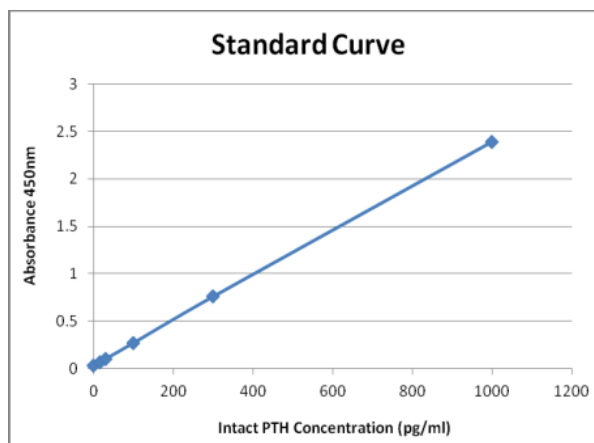
10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
Auf linearem Millimeterpapier wird eine Standardkurve ermittelt durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
Die Konzentrationen der Standards (in pg/mL) sind auf dem jeweiligen Fläschchenetikett angegeben.
- Zwei benachbarte Punkte werden mit einer geraden Linie verbunden (Punkt-zu-Punkt-Berechnung).
Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.

Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

	Konz. pg/mL	OD 450 nm
Standard 1	0	0.032
Standard 2	15	0.066
Standard 3	30	0.102
Standard 4	100	0.270
Standard 5	300	0.759
Standard 6	1000	2.392



11 GRENZEN DES TESTS

Natriumazid nicht als Konservierungsmittel verwenden. Natriumazid hemmt die HRP-Enzymaktivität.

Mit diesem Test wurde kein High-Dose-Hook Effekt bei hoch aufkonzentrierten Proben festgestellt.

Proben, die eine höhere Konzentration an intaktem PTH enthalten als der höchsten Standards, müssen mit dem 0 pg/mL-Standard verdünnt und erneut getestet werden.

(0 pg/mL-Standard zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.)

12 ASSAY-CHARACTERISTIKA

Die Daten entnehmen Sie bitte der englischen Arbeitsanleitung.

13 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Der folgende Bereich für PTH (Erwachsene in den USA) kann nur als Richtwert gelten: 10 - 65 pg/mL [7]

14 REFERENCES / LITERATURE

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.
7. Nakamoto, Jon M., Mason, Patrick W. Endocrinology: Test Selection and Interpretation. PTH, Intact and Calcium.
Page 123. 2012.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
LOT	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Estable hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité