

11972103 122

100 testes

Português**Função**

Imunoensaio para a determinação quantitativa in vitro da hormona paratiróidea intacta em soro e plasma humanos para o diagnóstico diferencial da hiper e hipocalcemia.

O imunoensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou "ECLIA") foi concebido para ser utilizado nos analisadores de imunoensaios Elecsys 1010/2010 e MODULAR ANALYTICS E170 (Módulo Elecsys) da Roche.

Características

A hormona paratiróidea (PTH) é formada na glândula paratiróidea e segregada na circulação sanguínea. A PTH intacta é composta por uma única cadeia polipeptídica com 84 aminoácidos e tem um peso molecular de aprox. 9500 daltons.

O fragmento N-terminal biologicamente activo tem uma semi-vida de poucos minutos. Uma medição selectiva da hormona paratiróidea (substancialmente) intacta permite uma determinação directa da actividade secretora da glândula paratiróidea.^{1,2}

A PTH provoca, juntamente com a vitamina D e a calcitonina, a mobilização de cálcio e de fosfato no sistema esquelético e aumenta a absorção de cálcio no intestino, assim como a eliminação de fosfatos através dos rins. A constância do nível de cálcio no sangue é garantida pela acção conjunta da PTH e da calcitonina. As concentrações elevadas de cálcio inibem, as baixas promovem a descarga de PTH.

Deficiências da função da glândula paratiróidea provocam o aumento (hipercalcemia) ou a diminuição (hipocalcemia) do nível de cálcio no sangue, que é condicionado por uma alteração da secreção de PTH.

A determinação do hipofuncionamento da glândula paratiróidea (hipoparatiroidismo) exige um teste de sensibilidade elevada para poder detectar um nível de PTH que se encontre substancialmente abaixo do normal.^{3,4}

Uma hiperfunção da glândula paratiróidea resulta num aumento da secreção de PTH (hiperparatiroidismo). A causa primária são adenomas da glândula paratiróidea. No hiperparatiroidismo secundário, o nível de cálcio no sangue é baixo devido a a outros estados patológicos (por ex., falta de vitamina D).

Hoje em dia, a determinação das concentrações de PTH e de cálcio é da maior importância para a análise do hiperparatiroidismo.

A determinação da PTH intraoperatoriamente durante a ressecção do adenoma da glândula paratiróidea tem também sido reportada.⁵ A determinação interoperativa da PTH permite ao cirurgião avaliar a conclusão da ressecção com base na rápida diminuição dos valores da PTH.^{6,7}

O teste Elecsys para determinação da PTH intacta utiliza a técnica sandwich em que o anticorpo monoclonal biotinilado reage com o fragmento N-terminal (1-37) e o anticorpo monoclonal marcado com o complexo de ruténio^a reage com o fragmento C-terminal (38-84). Os epítotos reconhecidos pelos anticorpos correspondem aos aminoácidos 26-32 e 55-64.

a) $\text{Tris}(2,2\text{-bipiridil})\text{ruténio(II)} (\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$

Princípio do teste

Técnica de sandwich. Duração total do ensaio: 18 minutos (analisadores MODULAR ANALYTICS E170 y Elecsys 2010) ou 9 minutos (analisador Elecsys 1010).

- 1ª incubação: 50 µl de amostra, um anticorpo monoclonal biotinilado específico de PTH e um anticorpo monoclonal específico de PTH marcado com complexo de ruténio reagem entre si e formam um complexo sandwich.
- 2ª incubação: Após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interacção da biotina e da estreptavidina.
- A mistura de reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, que é gerada especificamente pelo analisador por uma calibração de 2 pontos, e uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

Reagentes - soluções de trabalho

Dispositivo de reagentes Elecsys PTH, Ref. 11972103 - 100 testes

- M Micropartículas revestidas de estreptavidina (tampa transparente), 1 frasco, 6,5 ml:
Micropartículas revestidas de estreptavidina, 0,72 mg/ml, capacidade de fixação: 470 ng biotina/mg micropartículas; conservante.
- R1 Anticorpo anti-PTH-biotina (tampa cinzenta), 1 frasco, 10 ml:
Anticorpo monoclonal biotinilado anti-PTH (ratinho) 2,3 mg/l;
tampão fosfato 100 mmol/l, pH 7,0; conservante.
- R2 Anticorpo anti-PTH-Ru(bpy)₃²⁺ (tampa preta), 1 frasco, 10 ml:
Anticorpo monoclonal anti-PTH (ratinho) marcado com complexo de ruténio 2,0 mg/l; tampão fosfato 100 mmol/l, pH 7,0; conservante.

Precauções e advertências

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Respeite as precauções normais de manuseamento de reagentes laboratoriais.

Elimine todos os resíduos de acordo com os regulamentos locais.

Ficha de segurança fornecida a pedido, para uso profissional.

Evite a formação de espuma com todos os reagentes e com todo o tipo de amostras (amostras de pacientes, calibradores e controlos).

Preparação dos reagentes

Os reagentes do dispositivo foram incluídos numa unidade pronta a ser utilizada que não pode ser separada.

Toda a informação necessária ao correcto funcionamento é introduzida no analisador através dos respectivos códigos de barras do reagente.

Conservação e estabilidade

Conservar a 2-8°C.

Coloque o dispositivo de reagentes Elecsys PTH **na vertical** para assegurar a total disponibilidade das micropartículas durante a mistura automática, antes da utilização.

Estabilidade:

em frasco fechado a 2-8°C:	até ao fim do prazo de validade indicado
após abertura a 2-8°C:	12 semanas
no analisador	8 semanas
MODULAR ANALYTICS E170:	
no analisador Elecsys 2010:	8 semanas
no analisador Elecsys 1010:	4 semanas (guardado alternadamente no frigorífico e no analisador - temperatura ambiente 20-25°C; até 20 horas no total quando aberto)

Colheita e preparação das amostras

Apenas as amostras indicadas em seguida foram testadas e consideradas aceitáveis.

O soro é colhido utilizando tubos de amostra padrão.

Plasma tratado com EDTA-K₃.

Devido à breve semi-vida da PTH, para obtenção do soro, recomenda-se a centrifugação imediata do sangue.

A preferência deve ser dada a plasma com EDTA-K₃, uma vez que é mais estável do que o soro.

Critério: Recuperação dentro de 90-110% do valor sérico ou declive 0,9-1,1 + interceptação dentro de $< \pm 2 \times$ sensibilidade analítica + coeficiente de correlação $> 0,95$.

Soro: Estabilidade: 8 horas a 15-25°C, 2 dias a 2-8°C, 6 meses a -20°C.

Plasma: Estabilidade: 2 dias a 15-25°C, 3 dias a 2-8°C e 6 meses a -20°C.

Os diferentes tipos de amostras incluídos na lista foram testados com base numa selecção de tubos de colheita de amostras comercialmente disponíveis na altura em que o teste foi realizado, i.e. nem todos os tubos dos diferentes fabricantes disponíveis no mercado foram testados. Os sistemas de colheita de amostras de diferentes fabricantes podem, por sua vez, conter materiais diferentes que, em alguns casos, podem afectar os resultados dos testes. Ao utilizar amostras em tubos primários (sistemas de colheita de amostras), consulte as instruções do fabricante dos tubos.

As amostras que contêm precipitado têm de ser centrifugadas antes da realização do ensaio. Não utilize amostras e controlos estabilizados com azida. Antes da determinação, certifique-se de que as amostras dos pacientes, os calibradores e os controlos estão à temperatura ambiente (20-25°C).



Devido a possíveis efeitos de evaporação, as amostras, os calibradores e os controlos colocados no analisador deverão ser analisados no prazo de duas horas.

Materiais fornecidos

Consulte a secção "Reagentes - soluções de trabalho".

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Ref. 11972219, Elecsys PTH CalSet, para 4 x 1 ml
- Ref. 11972227, Elecsys PreciControl Bone, para 2 x 2 ml cada de PreciControl Bone 1, 2 e 3
- Equipamento normal de laboratório
- Analisadores Elecsys 1010/2010 ou MODULAR ANALYTICS E170

Accessórios para os analisadores Elecsys 1010 e 2010:

- Ref. 11662988, Elecsys ProCell, 6 x 380 ml de tampão do sistema
- Ref. 11662970, Elecsys CleanCell, 6 x 380 ml de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 11930346, Elecsys SysWash, 1 x 500 ml de aditivo para água de lavagem
- Ref. 11933159, Adaptador para SysClean
- Ref. 11706829, Elecsys 1010 AssayCup, 12 x 32 cuvetes de reacção ou Ref. 11706802, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 de cuvetes de reacção
- Ref. 11706799, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 pontas de pipeta

Accessórios para o analisador MODULAR ANALYTICS E170:

- Ref. 12135019, ProCell M, 1 x 2 l de tampão do sistema
- Ref. 12135027, CleanCell M, 1 x 2 l de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 03023141, PC/CC-Cups, 50 cuvetes para pré-aquecimento do ProCell M e do CleanCell M antes de usar
- Ref. 03005712, ProbeWash M, 12 x 70 ml de solução de limpeza para finalização da análise e lavagem durante a mudança de reagentes
- Ref. 03004899, PreClean M, 5 x 600 ml de solução de limpeza de detecção
- Ref. 12102137, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 tabuleiros x 84 cuvetes de reacção ou pontas de pipeta, sacos para lixo
- Ref. 03023150, Wasteliner, sacos para lixo
- Ref. 03027651, SysClean Adapter M

Accessórios para todos os analisadores:

- Ref. 11298500, Elecsys SysClean, 5 x 100 ml de solução de limpeza do sistema

Apenas disponível nos EUA:

- Ref. 12144743 Elecsys PTH CalCheck, 3 intervalos de concentração

Realização do ensaio

Para assegurar a correcta execução do ensaio, é importante cumprir as instruções fornecidas neste documento para o analisador utilizado. Consulte o manual do operador apropriado para obter informações mais específicas sobre o ensaio feito no analisador.

A ressuspensão das micropartículas é efectuada automaticamente antes de usar. Introduza os parâmetros específicos do teste através dos códigos de barras dos reagentes. Se, em algum caso excepcional, não for possível ler o código de barras, o código numérico de 15 dígitos deverá ser introduzido manualmente.

Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010: Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aprox. 20°C e coloque-os no disco dos reagentes (20°C) do analisador. Evite a formação de espuma. O sistema regula **automaticamente** a temperatura dos reagentes e a abertura/fecho dos frascos.

Analisador Elecsys 1010: Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aprox. 20-25°C e coloque-os no disco dos reagentes/amostras do analisador (temperatura ambiente a 20-25°C). Evite a formação de espuma. **Abra** as tampas dos frascos **manualmente** antes de usar e **feche manualmente** depois de usar. Conserve a 2-8°C depois de usar.

Calibração

Rastreabilidade: Este método foi padronizado contra um teste PTH (RIA) à venda no mercado.

Cada dispositivo de reagentes do teste Elecsys PTH contém um código de barras com informações específicas para a calibração do lote de

reagentes em questão. A curva principal previamente definida é adaptada ao analisador através do dispositivo Elecsys PTH CalSet.

Frequência das calibrações: Uma calibração por lote de reagentes utilizando reagente recém-colocado (i.e., dentro de um máximo de 24 horas após ter sido registado no analisador). Devem ser feitas as seguintes recalibrações:

Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010:

- passado 1 mês (28 dias) quando se utiliza o mesmo lote de reagentes
- passados 7 dias (quando se utiliza o mesmo dispositivo de reagentes no analisador)

Analisador Elecsys 1010:

- com cada dispositivo de reagentes
- passados 7 dias (temperatura ambiente de 20-25°C)
- passados 3 dias (temperatura ambiente de 25-32°C)

Para todos os analisadores:

- conforme necessário: p. ex., em resultados de ensaios de controlo de qualidade fora dos limites especificados.

Controlo de qualidade

Para o controlo de qualidade, utilize o Elecsys PreciControl Bone 1, 2 e 3. Adicionalmente pode ser utilizado outro material de controlo adequado.

Efectue os controlos dos diversos intervalos de concentração como determinações simples, pelo menos uma vez em cada 24 horas, quando o teste estiver a ser utilizado, uma vez por dispositivo de reagentes e a seguir a cada calibração. Os intervalos e limites de controlo devem ser adaptados às exigências específicas de cada laboratório. Os valores obtidos devem situar-se dentro dos limites definidos.

Cada laboratório deve estabelecer as medidas correctivas a tomar no caso de os valores se situarem fora dos limites.

Cálculo

O analisador calcula automaticamente a concentração de analito de cada amostra (em pg/ml ou pmol/l).

Factores de conversão: $\text{pg/ml} \times 0,106 = \text{pmol/l}$
 $\text{pmol/l} \times 9,43 = \text{pg/ml}$

Limitações – interferências

O ensaio não é afectado pela icterícia (bilirrubina < 1.112 µmol/l ou < 65 mg/dl), hemólise (Hb < 0,932 mmol/l ou < 1,5 g/dl), lipemia (Intralipid < 1.500 mg/dl) e biotina < 205 nmol/l ou < 50 ng/ml.

Critério: recuperação dentro de ± 10% do valor inicial.

Nos doentes em tratamento com doses elevadas de biotina (i.e. > 5 mg/dia), as amostras só deverão ser colhidas no mínimo 8 horas após a última administração de biotina.

Não foi observada interferência do factor reumatóide até uma concentração de 1.500 UI/ml.

Não foi observado qualquer efeito "high-dose hook" em concentrações de PTH até 17.000 pg/ml (1802 pmol/l).

Foram efectuados testes in vitro com 16 fármacos frequentemente utilizados.

Não se encontrou qualquer interferência com o ensaio.

Tal como acontece com todos os testes que contêm anticorpos monoclonais de ratinho, este teste pode produzir resultados errados em amostras colhidas em pacientes tratados com este tipo de anticorpos ou que os receberam para fins de diagnóstico.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para o ruténio.

O teste contém aditivos que minimizam estes efeitos.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para a estreptavidina.

Quando o objectivo é o diagnóstico, os resultados devem ser sempre interpretados em conjunto com a anamnese do paciente, o exame clínico e outros resultados.

Intervalo de medição

1,20–5.000 pg/ml ou 0,127–530 pmol/l (definido pelo limite de detecção inferior e pelo máximo da curva principal). Os valores inferiores ao limite de detecção são indicados como < 1,20 pg/ml (< 0,127 pmol/l) e os valores acima do intervalo de medição como > 5.000 pg/ml (> 530 pmol/l).

Diluição

Não necessária devido à grande amplitude do intervalo de medição.



Valores teóricos^{8,9}

15–65 pg/ml (1,6–6,9 pmol/l)

Cada laboratório deve verificar a transferibilidade dos valores teóricos para a sua própria população de pacientes e, se necessário, determinar os seus próprios intervalos de referência.

Dados específicos sobre o desempenho

São apresentados a seguir dados representativos do desempenho nos analisadores. Os resultados podem diferir de laboratório para laboratório.

Precisão

A reprodutibilidade foi determinada com reagentes Elecsys, uma pool de soros humanos e controlos de acordo com um protocolo modificado (EP5-A) do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 vezes por dia durante 9 dias (n = 54), precisão intra-ensaio no analisador MODULAR ANALYTICS E170, n = 21. Obtiveram-se os seguintes resultados:

Elecsys 1010/2010		Precisão intra-ensaio			Precisão total			
Amostra	Média		DP		CV	DP		CV
	pg/ml	pmol/l	pg/ml	pmol/l	%	pg/ml	pmol/l	%
SH ^b 1	30,0	3,18	1,62	0,17	5,4	1,77	0,19	5,9
SH 2	62,2	6,59	2,49	0,26	4,0	2,69	0,29	4,3
SH 3	271	28,7	10,9	1,16	4,0	11,7	1,24	4,3
PC ^c Bone1	44,3	4,70	2,56	0,27	5,8	3,16	0,33	7,1
PC Bone2	161	17,1	5,44	0,58	3,4	8,00	0,85	5,0
PC Bone3	702	74,4	27,1	2,87	3,9	38,0	4,03	5,4

b) SH = soro humano

c) PC = PreciControl

MODULAR ANALYTICS E170

Amostra	Precisão intra-ensaio					Precisão total				
	Média		DP		CV	Média		DP		CV
	pg/ml	pmol/l	pg/ml	pmol/l	%	pg/ml	pmol/l	pg/ml	pmol/l	%
SH 1	21,9	2,32	0,44	0,05	2,0	23,2	2,46	0,79	0,08	3,4
SH 2	35,0	3,71	0,43	0,05	1,2	80,9	8,58	2,01	0,21	2,5
SH 3	123	13,04	1,31	0,14	1,1	240	25,4	6,72	0,71	2,8
PC Bone1	72,7	7,71	1,63	0,17	2,2	73,0	7,74	1,21	1,34	1,7
PC Bone2	236	25,0	6,58	0,70	2,8	238	25,2	3,86	4,27	1,6
PC Bone3	1092	116	6,97	0,74	0,6	1098	116	17,9	1,90	1,6

Sensibilidade analítica (limite de detecção inferior)

1,20 pg/ml (0,127 pmol/l)

O limite de detecção representa o nível de analito mais baixo mensurável passível de ser distinguido de zero. É calculado como o valor situado dois desvios padrão (DP) acima do padrão mais baixo (calibrador principal, padrão 1 + 2 DP, precisão intra-ensaio, n = 21).

Comparação dos métodos

Uma comparação do teste Elecsys PTH (y) com um teste de PTH à venda no mercado (x), utilizando amostras clínicas, teve como resultado as seguintes correlações (pg/ml):

Número de amostras medidas: 152

Passing/Bablok¹⁰

y = 1,01x + 4,86

τ = 0,886

SD (md68) = 7,67

Regressão linear

y = 0,83x + 19,4

r = 0,991

Sy.x = 35,5

As concentrações das amostras variaram entre aprox. 1,4 e 1.880 pg/ml (0,15 e 199 pmol/l).

Especificidade analítica

No caso dos anticorpos monoclonais utilizados, observaram-se as seguintes reacções cruzadas:

Para osteocalcina, fragmento 1-37 da PTH, fosfatase alcalina específica dos ossos e β-CrossLaps: sem reacção cruzada detectável.

Sensibilidade funcional

6,0 pg/ml (0,64 pmol/l)

A sensibilidade funcional é a concentração de analito mais baixa que pode ser medida de modo reprodutível com um coeficiente de variação inter-ensaio < 20%.

Bibliografia

- Silverman R, Yalow RS. Heterogeneity of parathyroid hormone: Clinical and physiologic implications. J Clin Invest 1973;52:1958-1971.
- Flehtje D, Schmidt-Gayk H, Fischer S, Stern J, Blind E, Buhner H, Herfarth Ch. Intact parathyroid hormone in primary hyperparathyroidism. Br J Surg 1990;77:168-172.
- Nussbaum S, Potts JT. Advances in Immunoassays for Parathyroid Hormone. Clinical Applications to Skeletal Disorders of Bone and Mineral Metabolism. In Bilezikian JP, Levine MA, Marcus R (eds). The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts. Raven Press, New York 1994:157-169.
- Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, Potts JT. Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA 1963;49:613-617.
- Bergenfels A, Nordén NE, Ahrén B. Intraoperative fall in plasma levels of intact parathyroid hormone after removal of one enlarged parathyroid gland in hyperthyroid patients. Eur J Surg 1991;157:109-112.
- Boggs JE, Irvin GL, Molinari AS, Deriso GT. Intraoperative parathyroid hormone monitoring as an adjunct to parathyroidectomy. Surgery 1996;120:954-958.
- Clary BM, Garner SC, Leight GS. Intraoperative parathyroid hormone monitoring during parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism. Surgery 1997;122:1034-1039.
- Blind E. Measurement of Intact Parathyroid Hormone by an Extracting Two-Site Immunometric Assay. In: Schmidt-Gayk H, Armbruster FP, Bouillon R, (eds). Calcium regulating hormones, vitamin D metabolites, an cyclic AMP. Heidelberg: Springer 1990:151.
- Thomas L. Parathyroid hormone (PTH). Clinical Laboratory Diagnosis. TH-Books, Frankfurt. 1st english edition 1998:248-250.
- Bablok W, et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.

NOTA PARA O COMPRADOR: LIMITED LICENSE

A aquisição deste produto permite que o comprador o utilize exclusivamente para diagnóstico in vitro humano pela tecnologia ECL. Nenhuma patente geral ou outra licença de qualquer tipo, à exceção deste direito específico de uso de compra, é concedida por este meio. Este produto não pode ser usado pelo comprador na pesquisa/desenvolvimento em ciências da vida, em testes de auto-diagnóstico, na identificação/desenvolvimento de drogas ou em qualquer utilização ou teste veterinário, alimentar, de água ou ambiental.

Para mais informações, consulte o manual do operador adequado ao analisador, as folhas de aplicação respectivas, a informação do produto e os folhetos informativos de todos os componentes necessários.

As alterações ou os acréscimos significativos estão assinalados por uma barra de alteração na margem. As alterações dos parâmetros de teste do código de barras do reagente que já foram introduzidas devem ser editadas manualmente.

©2005 Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

