

GENOVA



Regione Liguria

**AZIENDA SANITARIA GENOVESE**

**3**

**"13° Simposio ann. ELAS-Italia LIGAND  
ASSAY 2007**

**Bologna 19-21 novembre 2007 "**

**Funzionalità Paratiroidea:  
Nuove frontiere della diagnostica**



Regione Liguria

**AZIENDA SANITARIA GENOVESE**

**3**

Dipartimento di Patologia Clinica

Direttore Dott. L.C. Bottaro

**“Valutazione Analitica di un Nuovo Metodo  
Analitico per la misura del PTH”**

**Dott. P. Pedrazzi**

# Problematiche del dosaggio PTH

- Sono note le difficoltà che si incontrano in laboratorio nel dosaggio del Paratormone.
- Importanza della **fase preanalitica**

# Preanalitica

- La corretta manipolazione dei campioni dei pazienti è fondamentale per garantire l'integrità della molecola
- Il PTH intatto è **labile**, ed è suscettibile di **frammentazione**
- Questa instabilità dipende sia dal **tempo** che dalla **temperatura**

# PTH Fragments in serum

N-terminal

Mid-Region

C-terminal



**N-terminal: needed for biological activity**



**Mid-Region: needed for receptor binding**



**C-terminal: Actual no function know**



Il PTH viene metabolizzato rapidamente da fegato e reni in frammenti N-terminali biologicamente attivi e frammenti C-terminali biologicamente inattivi. I test del PTH intatto riflettono accuratamente la cinetica della secrezione del PTH

# Conservazione del PTH

<b>Temperatura</b>	<b>Stabilità plasma EDTA</b>	<b>Stabilità siero</b>
Temperatura Ambiente	8 ore	4 ore
4 °C	72 ore	48 ore
-70 °C	8 mesi	Non testata

# Esempio di interferenza sulla specificità (ADVIA- Centaur)

Sostanze interferenti	Quantità aggiunta (pg/ml)	%le di reattività crociata
F PTH(1-34)	300	0,74
F PTH (39-68)	100.000	0,005
F PTH (39-84)	100.000	0,024
F.PTH (44-68)	100.000	0,007
F.PTH(53-84)	100.000	0,003
Calcitonina	100.000	0,0004

# Esempio di interferenza sulla specificità (ST AIA Pack iPTH)

Sostanza	% cross reattività
PTH (1-34)	<0.02
PTH (13-34)	<0.02
PTH (39-84)	<0.02
PTH (53-84)	<0.02

# TOSOH AIA-Pack Intact PTH

- Second generation PTH test
- Name: INTACT PTH ASSAY
- No cross reactivity with C terminal fragments
  - First generation test
    - Not in the market anymore
- Detect two form:
  - PTH 1-84
  - PTH 7-84

# TOSOH AIA-Pack Intact PTH

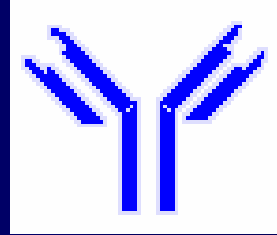
- Test i.e. fluorimetrico (FEIA) mediante ST AIA test pack Intact PTH consiste in una coppetta sigillata contenente la fase solida (sferette di ferrite) sulla quale è immobilizzato con legame chimico il primo Ab anti PTH e, in forma liofila l'Ab monoclonale specifico marcato con Fosf. Alcalina.
- Dopo incubazione la quantità di Ag specifico legato alla fase solida è dir.proporz. alla conc.ne di PTH
- La stabilità della curva risulta di 5 settimane
- I valori di CV dei valori dei cal. in duplicato sono compresi fra 1,63 % e 5,68 %

# TOSOH AIA-Pack Intact PTH

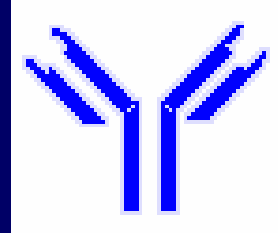
N-terminal

Mid-Region

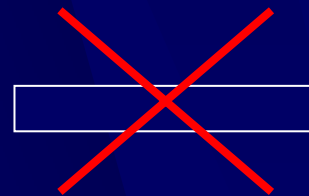
C-terminal



1-84



7-84



C-Terminal

# Tabella comparativa dei sistemi valutati nell'indagine

	AIA 1800	LIAISON	CENTAUR	IMMULITE DPC	RIA ELSA
Metodo	Test Immunoenzimatico a 2 siti	Test immunologico a 2 siti di tipo sandwich	Test immunologico a 2 siti di tipo sandwich		Test immunoradiometrico sandwich
Range di Riferimento	8,7 - 79,6	17,3 - 72,9	14 - 72	8 - 74	11 - 62
Range di Misura	fino a 2400 pg/mL	2,5 - 2500 pg/mL	2,5 - 1900 pg/mL	fino a 2500 pg/mL	
Sensibilità Analitica	1,0 pg/mL	1,0 pg/mL	1,0 pg/mL	4 pg/mL	
Sensibilità Funzionale	n.d	2,1 pg/mL			
STD Calibrator					
hook effect				nessuno fino a 1000 pg/mL	
CV% intra assay	4%		5,20%	7,50%	
CV% inter assay	4,9%		5,80%	7,30%	
% linearity				94%	
Anticorpi					mono - poli (capra)
Campione	Siero/Plasma EDTA		siero - plasma EDTA		

## ELSA-PTH (CIS bio, Cedex)

- Effettua il dosaggio immunoradiometrico della catena biologicamente intatta di 84 aa. dell'ormone
- Si basa sul principio della tecnica sandwich su fase solida
- E' costituito da un Ab monocl. antiPTH umano fissato sull'ELSA immobilizzato sul fondo della provetta e specifico per la parte centrale e C-terminale (39-84 aa) e di Ab radiomarcato monoclonali anti PTH<sup>125</sup>I (capra) che riconoscono invece la parte N-terminale (1-34 aa)
- La quantità è dir. proporzionale al PTH umano
- Range di normalità 11-62 pg/ml

## CONCLUSIONI

- Per quanto concerne i diversi gruppi di età considerati, nessuna differenza significativa dei livelli medi della conc.ne di PTH è stata dimostrata nella casistica dei soggetti normali
- Questi dati dimostrano ottime caratteristiche di riproducibilità ed affidabilità della metodica FEIA
- Le due metodiche mostrano una buona correlazione.
- Sui livelli patologici e sulla definizione dei range di normalità si dovrà ulteriormente ampliare e caratterizzare la casistica

# LIAISON DIA-Sorin

- E' uno strumento LIA. Lavora con microparticelle paramagnetiche con fase solida e chemiluminescenza diretta come segnale, utilizzando come tracciante un derivato dell'isoluminolo.
- L'emissione di luce in chemiluminescenza è ottenuta in 3 secondi in una camera di conta e misurata ad una lunghezza d'onda pari a 420 nm
- Come unità di misura viene utilizzata l'Unità di luce relativa (RLU)

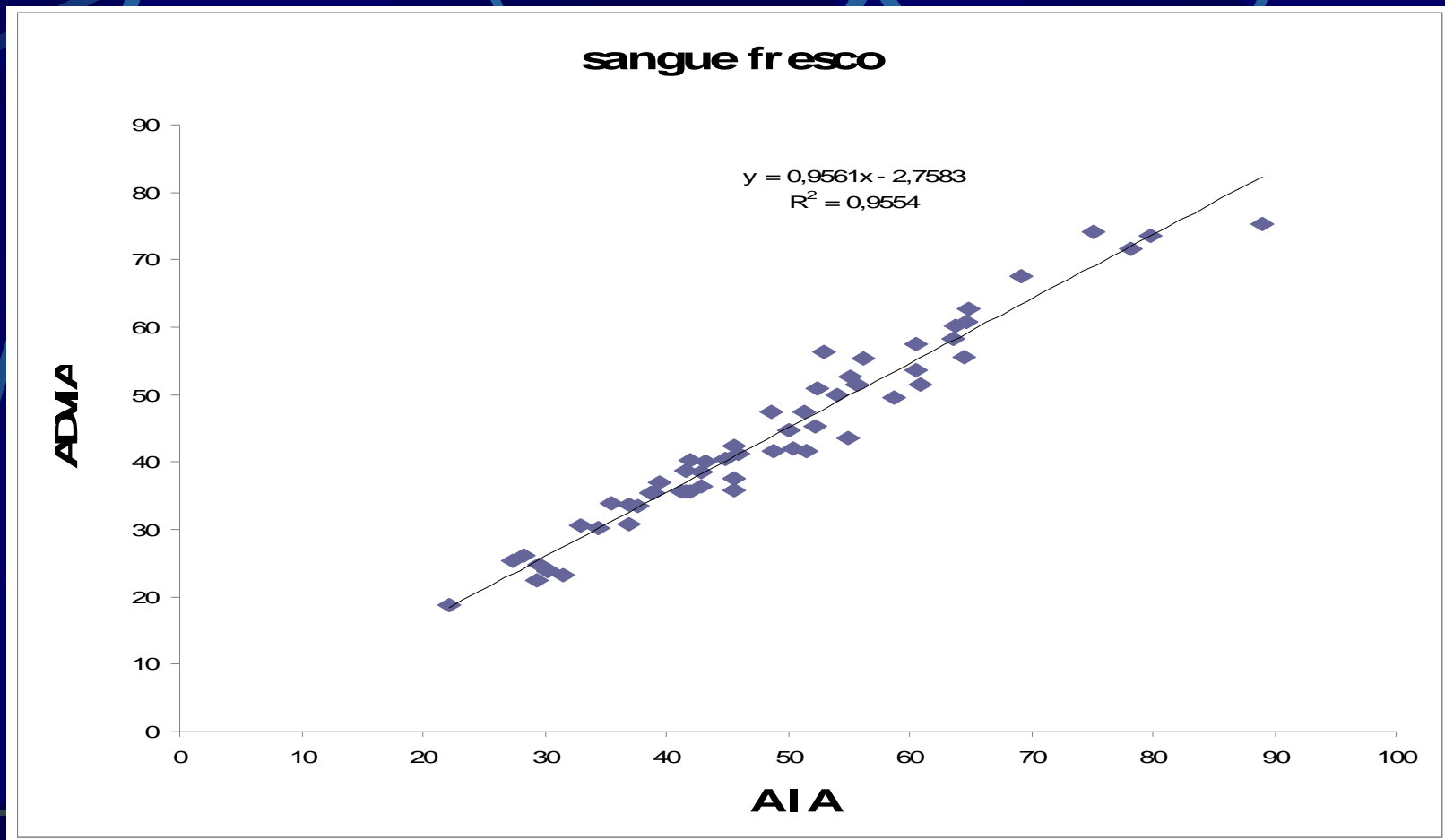
## CONCLUSIONI

- L'uso di tali indici (riportati in tabella) si rende necessario quando si vogliono mettere a confronto misure di variabilità, quindi dall'analisi dei suddetti dati è evidente come, omogeneizzando le misure a confronto mediante il calcolo del coefficiente di variazione, **la variabilità dei due fenomeni è all'incirca uguale.**

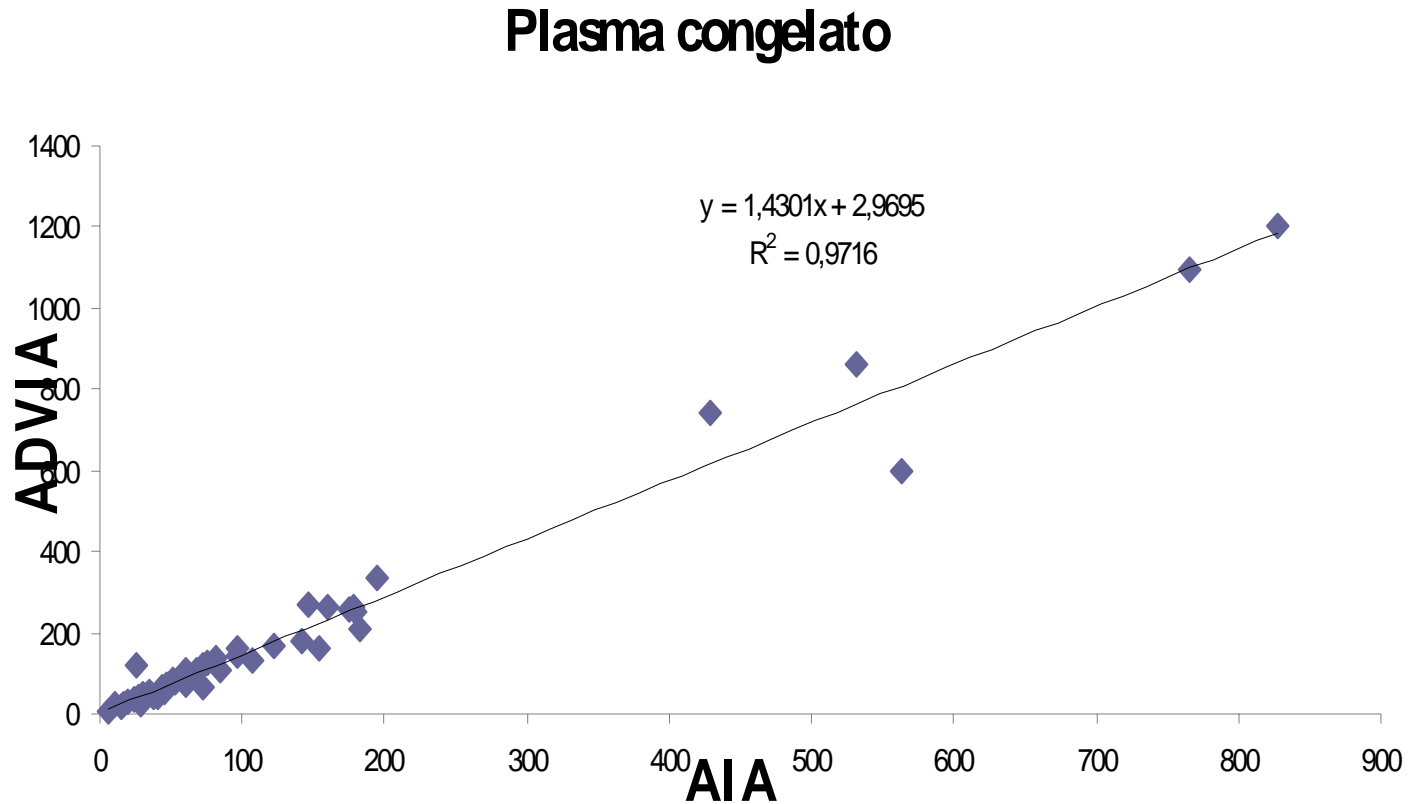
# Metodica ADVIA Centaur

- Ab policlonale caprino anti PTH umano (1-34 N term)+estere di acridinio
- Ab caprino biotinilato anti PTH umano (39-84)
- La Streptavidina presente nella fase solida è legata covalentemente a particelle di lattice paramagnetiche

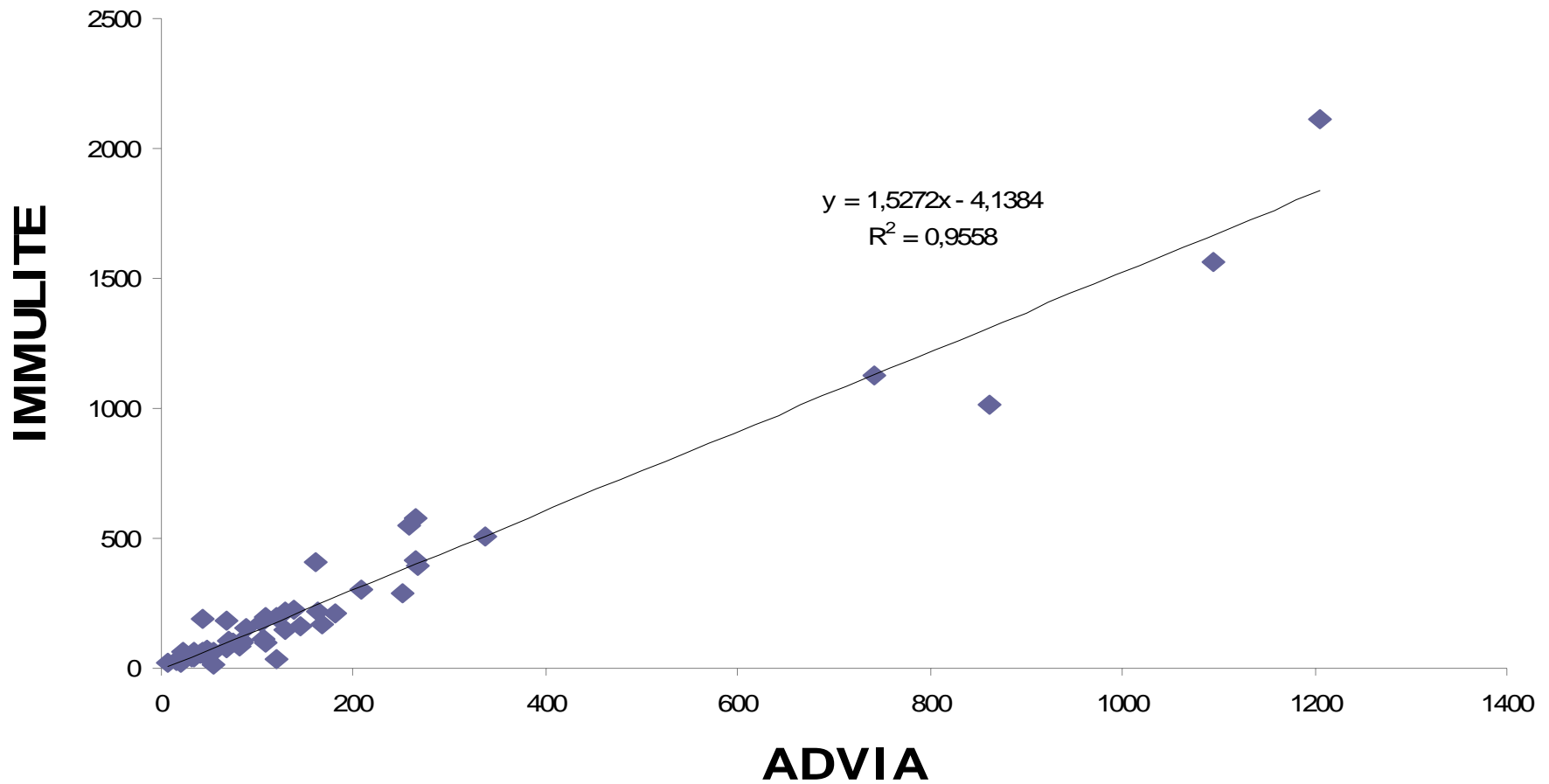
# Correlazione lineare AIA/ADVIA su campione fresco



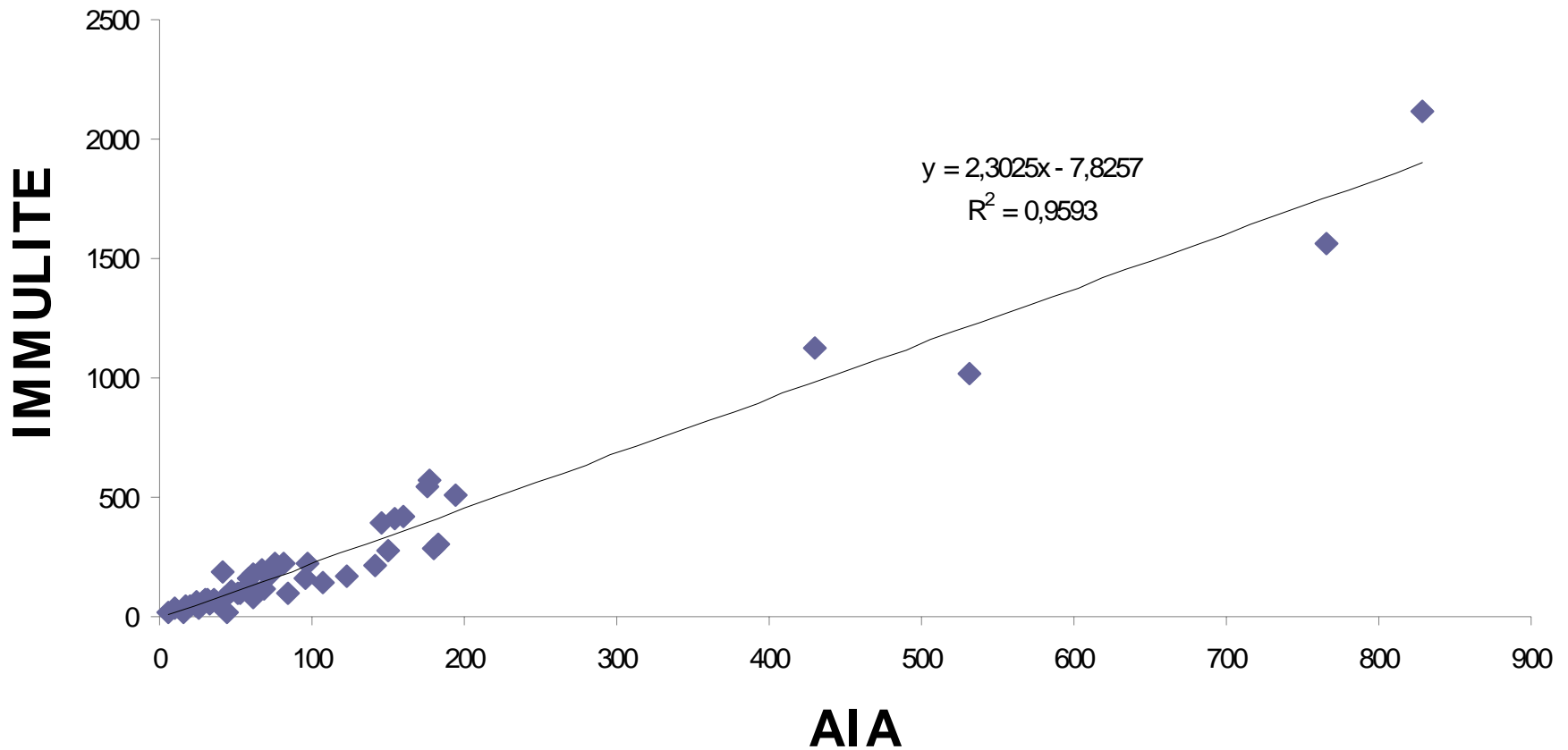
# Correlazione lineare AIA/ADVIA con plasma congelato



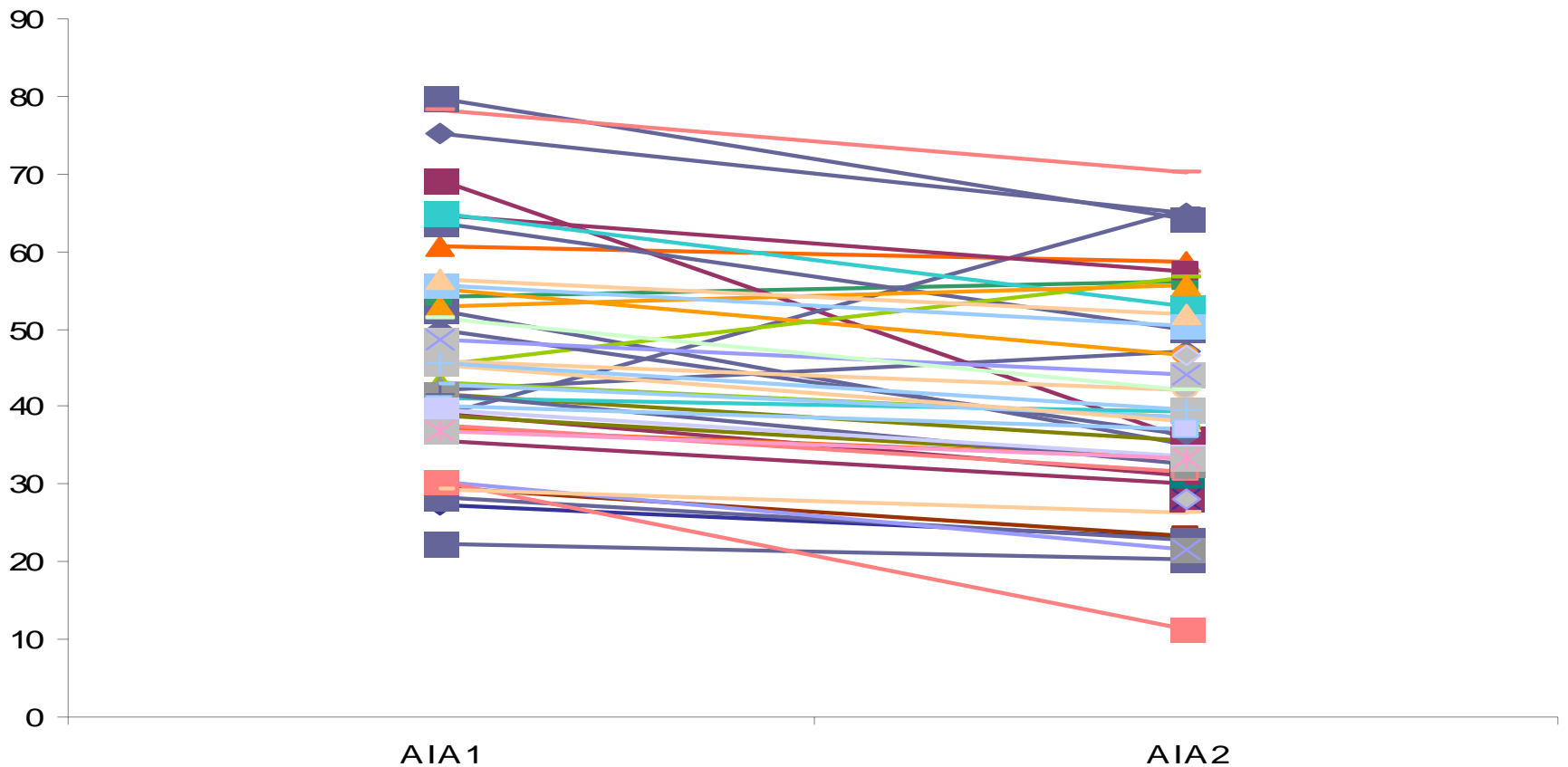
# Correlazione lineare ADVIA/Immulite



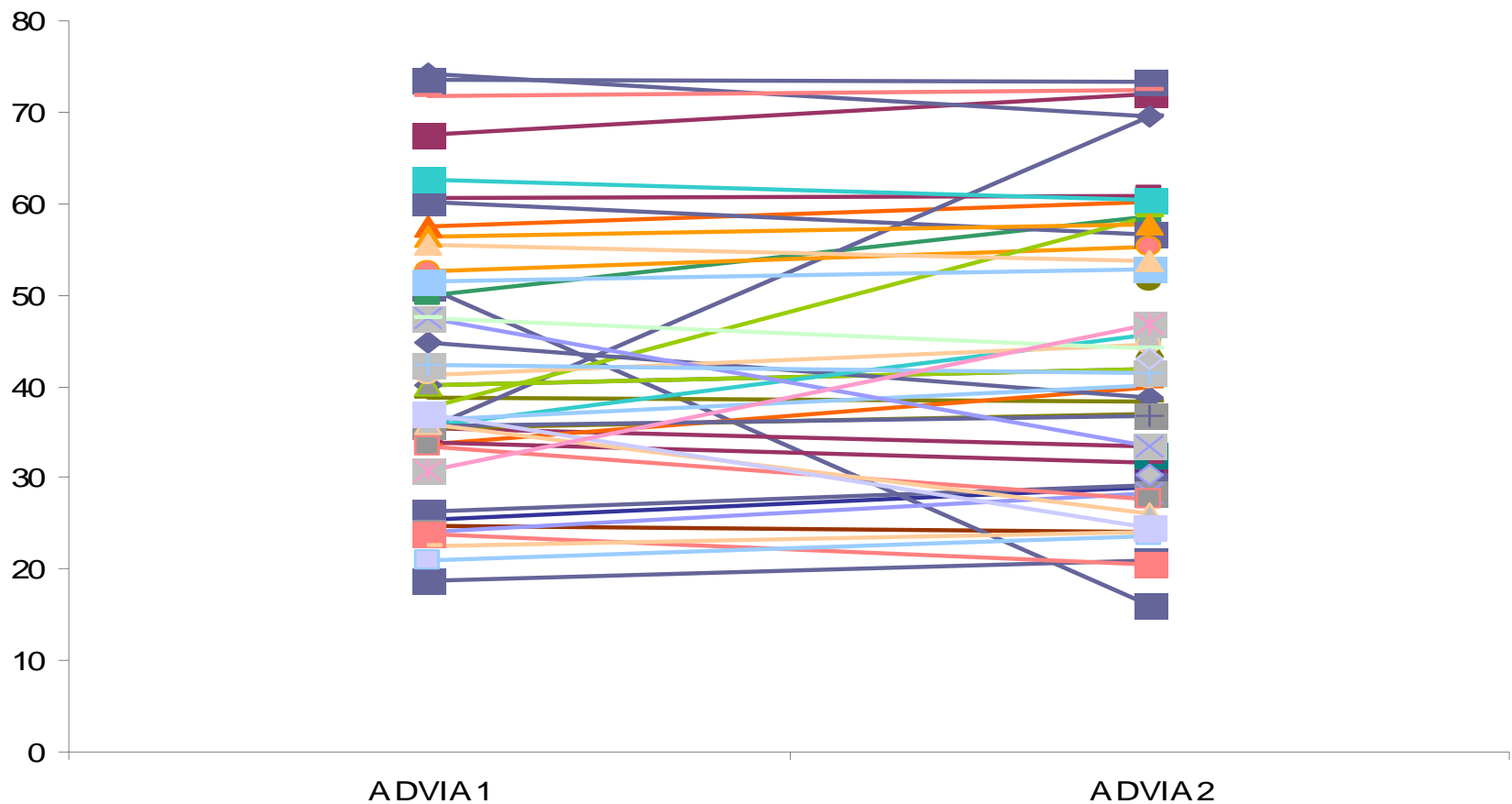
# Correlazione lineare AIA/Immulite



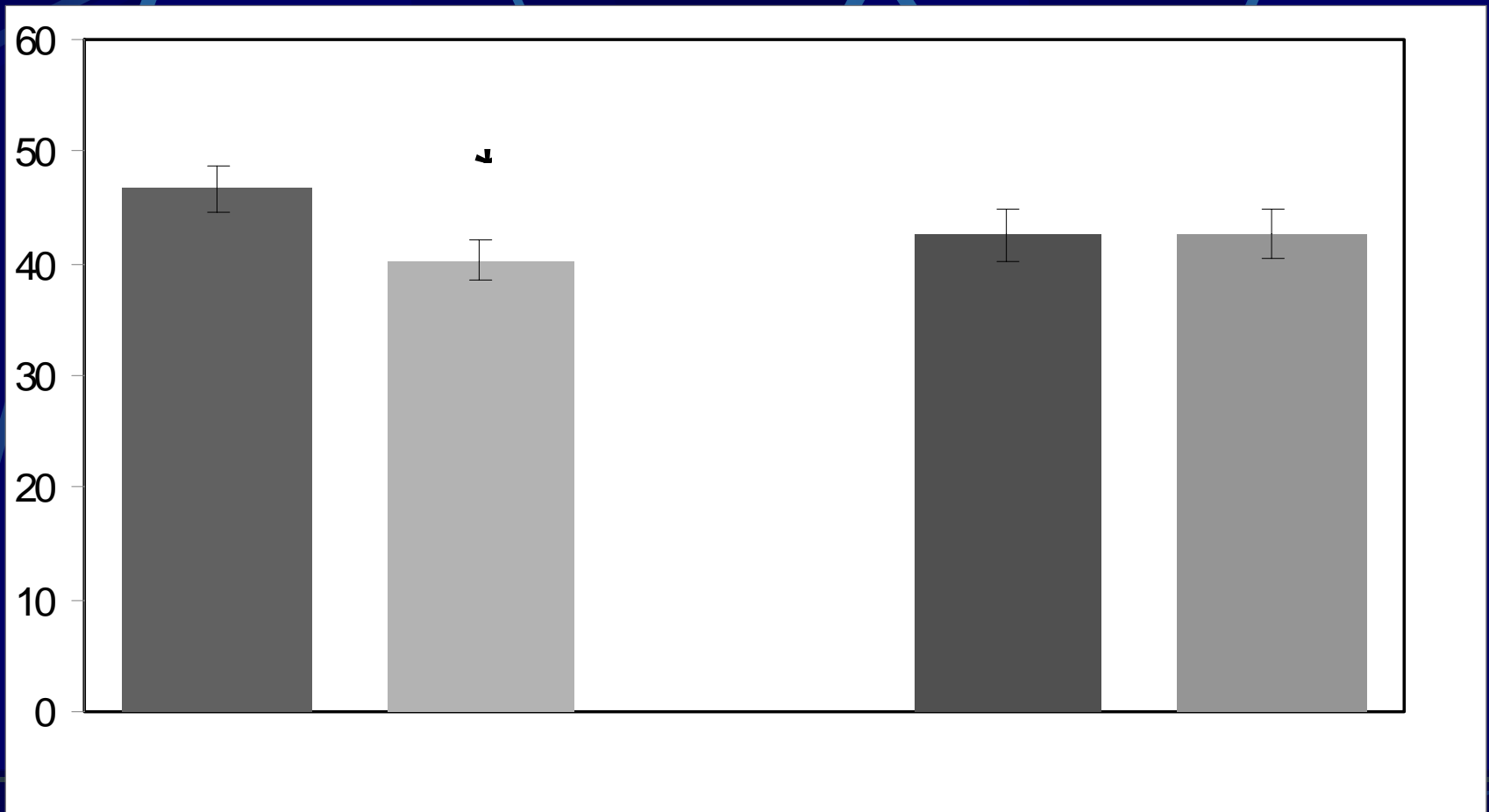
# Variazioni risultati AIA (fresco - congelato)



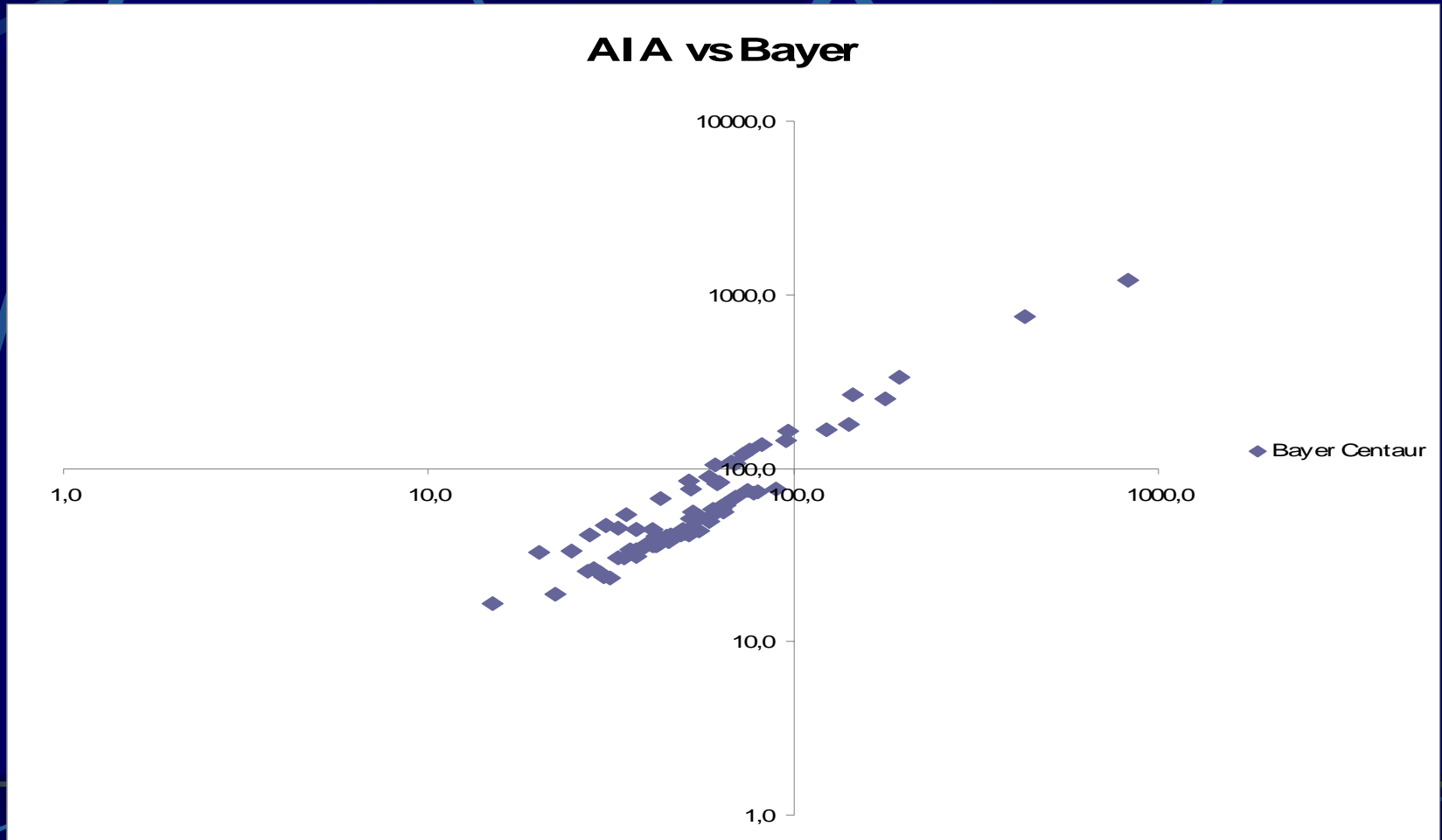
# Variazioni risultati ADVIA (fresco-congelato)



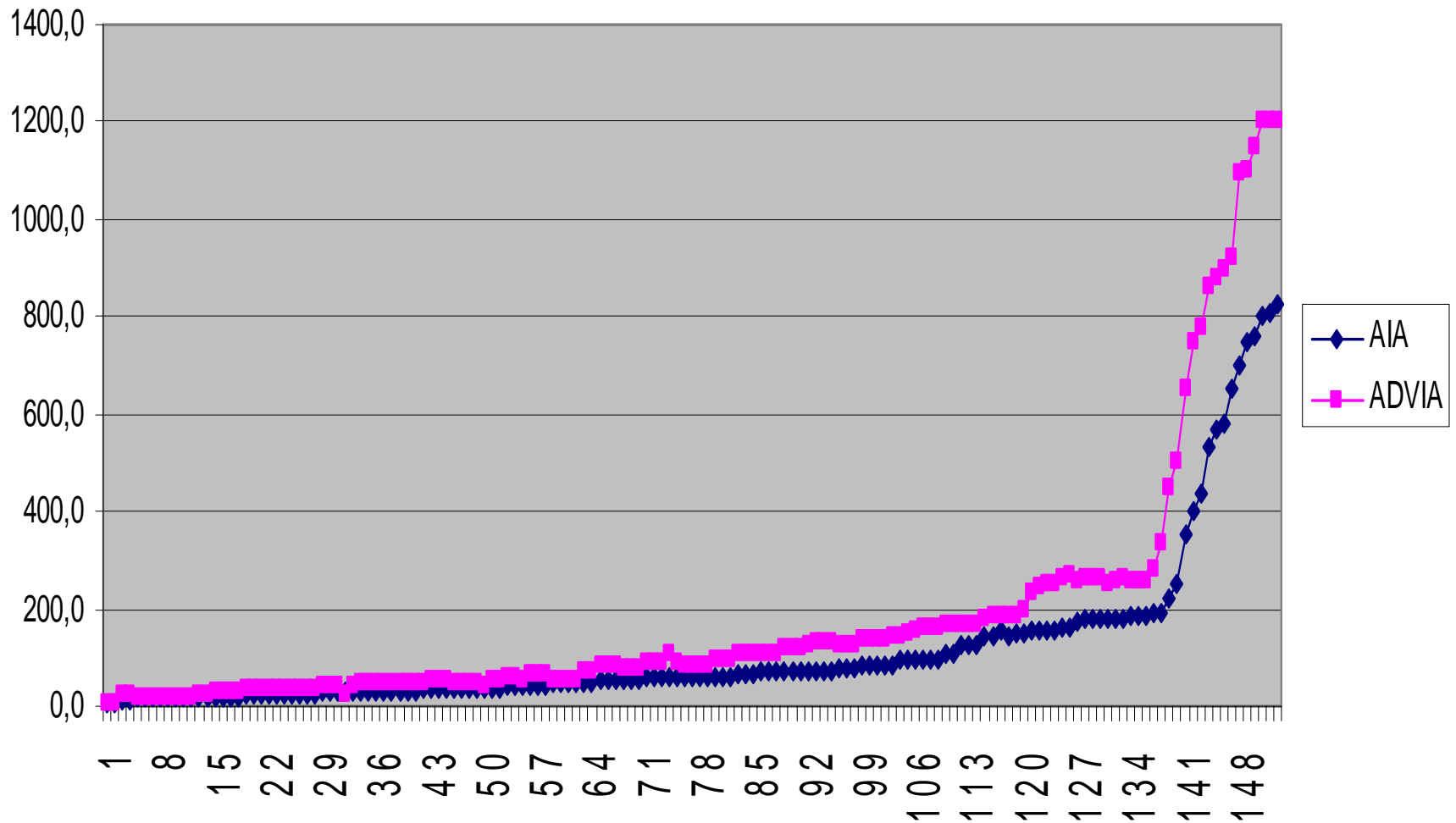
# Differenza media dei valori attenuti AIA/ADVIA (congelato-scongelato)



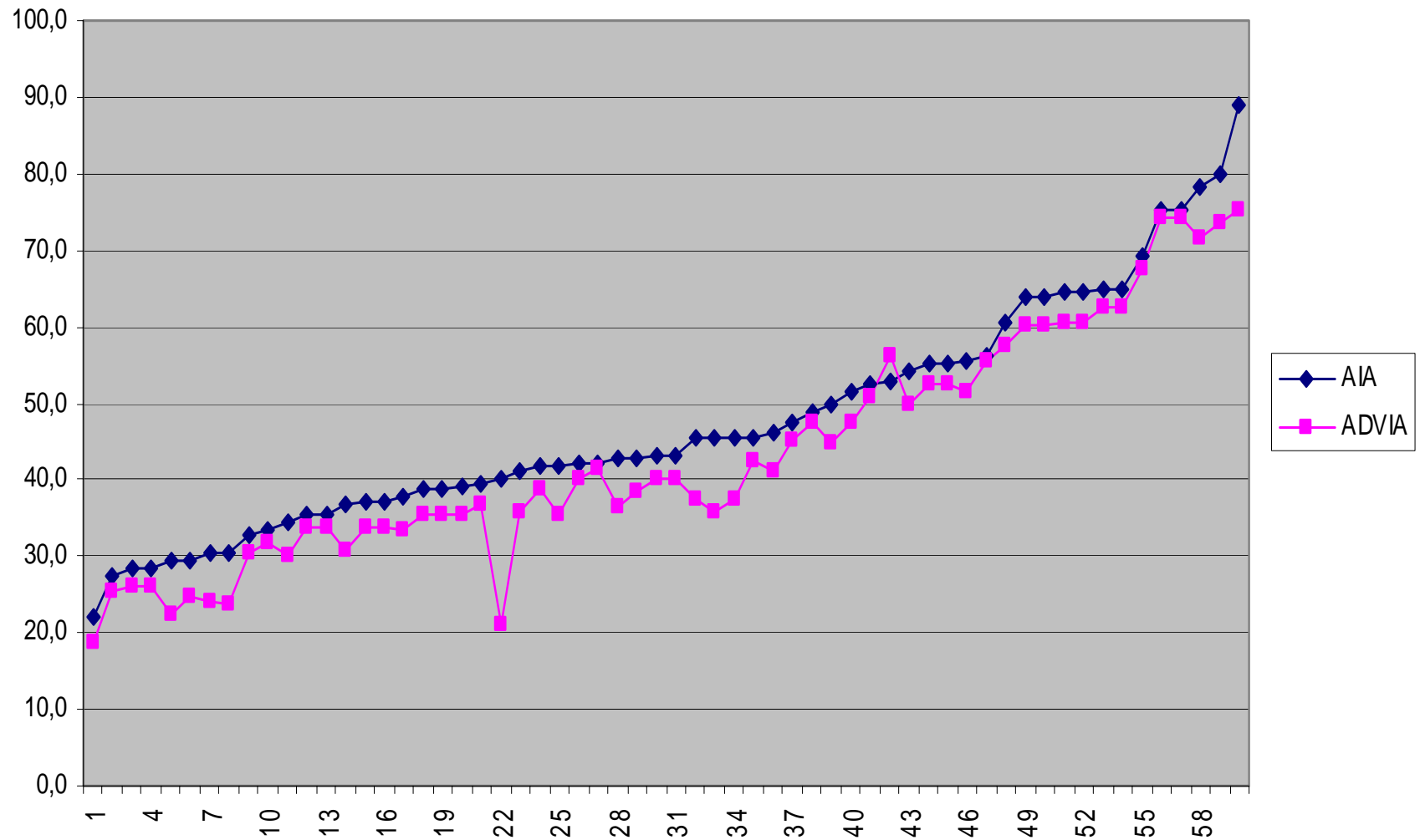
# Distribuzione risultati ottenuti AIA / ADVIA



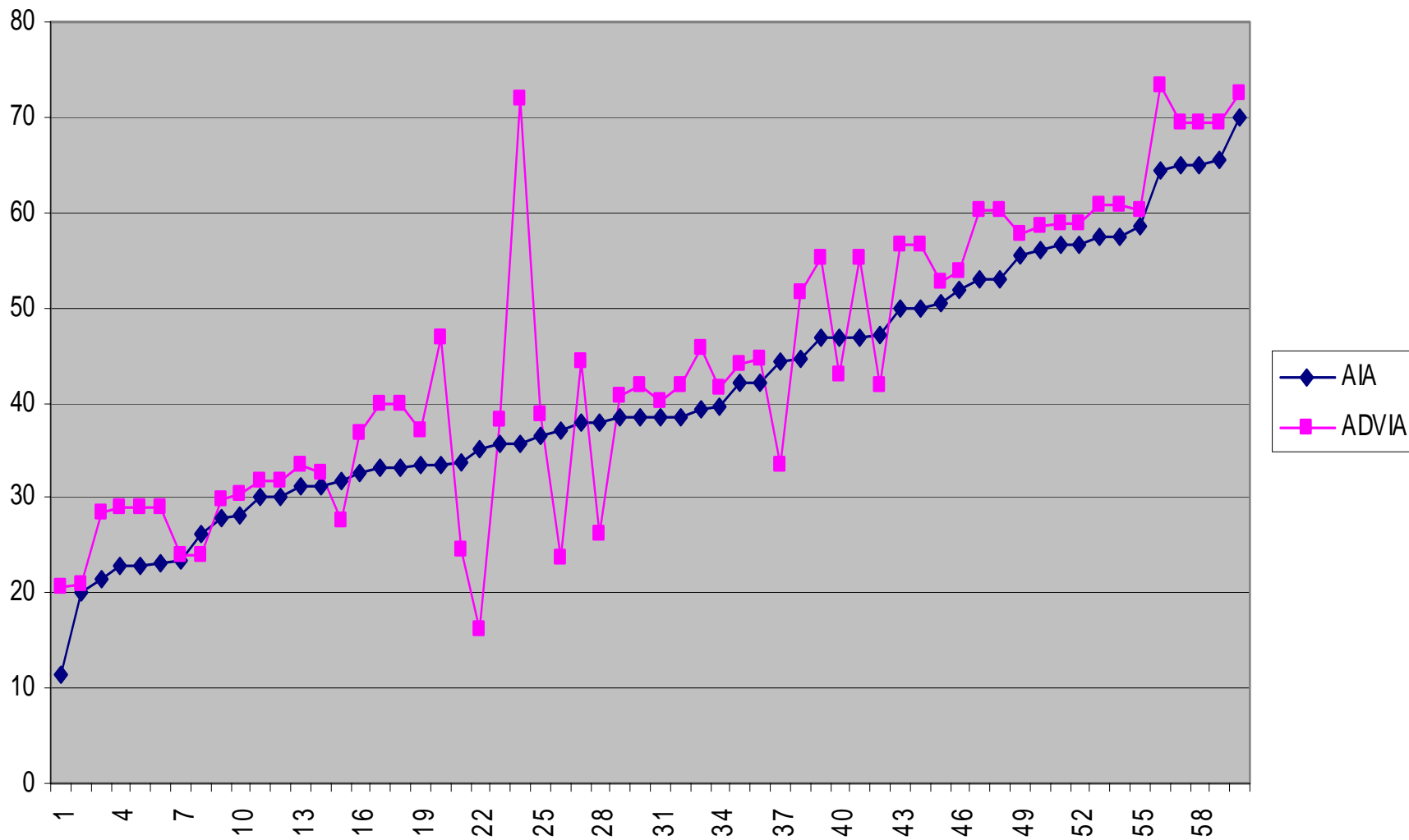
### Confronto valori PTH AIA/ADVIA plasma congelato paz. Endocr.DISEM



Dosaggio AIA/ADVIA (donatori - fresco)



**Dosaggio PTH AIA/ADVIA**  
**(donatori dopo congelamento-scongelamento)**



# Donatori: dosaggio su siero fresco

SEDUTE PRECEDENTI	n	Mean	SD	SE
AIA	60	46,62	14,67	2,074
ADVIA	60	42,45	14,79	2,091
Difference	60	4,18	3,41	0,482
Difference between means	4,18			
95% CI	3,21 to 5,15			
t statistic	8.67			
2-tailed p	<0.0001			

# Donatori: dosaggio su plasma congelato-scongelato

SEDUTA DEL 02-11-07	n	Mean	SD	SE
AIA	60	40,28	13,12	1,856
ADVIA	60	42,67	15,30	2,164
Difference	60	-2,39	7,76	1,098

Difference between means	-2,39
95% CI	-4,59 to -0,18

t statistic	-2.17
2-tailed p	0,0346

# Conclusioni

- Le differenze osservate con i differenti metodi sono sistematiche e, quindi, è possibile l'interscambiabilità dei risultati.
- Le differenze di stima fra AIA, ADVIA a seconda del tipo di campione (sovrastima di AIA nel campione fresco e di ADVIA nel congelato) e tra i valori riscontrati con Immulite nel plasma fresco in confronto ai campioni congelati, valutati con le altre due metodiche meritano una ulteriore conferma.
- E' importante che nella refertazione venga precisato non solo il metodo analitico usato ma anche le modalità del prelievo

# Ringraziamenti

- Prof. F.Radicioni, Prof.F.M. Lattanzio, Prof. F.Minuto, Prof.G.C.Zucchelli, Prof. M.Bagnasco, Dott. L.Fazzuoli
- Dott.P.Bellati
- Un particolare ringraziamento al Dott. Vidotto Del CT del P.O.Micone ASL 3 Genovese Distretto 2 per la gentile collaborazione.