

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Calcitonin ultra sensitive ELISA



DEKAP0421



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Content / Inhaltsverzeichnis / Tabella dei contenuti

| | | |
|-----|--------------------------------------------------|----|
| 1. | INTENDED USE | 4 |
| 2. | CLINICAL BACKGROUND | 4 |
| 3. | PRINCIPLES OF THE METHOD | 4 |
| 4. | REAGENTS PROVIDED..... | 5 |
| 5. | SUPPLIES NOT PROVIDED | 5 |
| 6. | REAGENT PREPARATION | 6 |
| 7. | STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS..... | 6 |
| 8. | SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 6 |
| 9. | PROCEDURE | 7 |
| 10. | CALCULATION OF RESULTS | 7 |
| 11. | TYPICAL DATA | 8 |
| 12. | PERFORMANCE AND LIMITATIONS..... | 8 |
| 13. | INTERNAL QUALITY CONTROL | 9 |
| 14. | REFERENCE INTERVALS..... | 9 |
| 15. | PRECAUTIONS AND WARNINGS..... | 9 |
| 16. | BIBLIOGRAPHY | 10 |
| 17. | SUMMARY OF THE PROTOCOL | 10 |
| | | |
| 1. | VERWENDUNGSZWECK | 11 |
| 2. | KLINISCHER HINTERGRUND | 11 |
| 3. | GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG | 11 |
| 4. | MITGELIEFERTE REAGENZIEN | 12 |
| 5. | ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL..... | 12 |
| 6. | VORBEREITUNG DER REAGENZIEN | 13 |
| 7. | AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 13 |
| 8. | PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG..... | 13 |
| 9. | DURCHFÜHRUNG | 14 |
| 10. | BERECHNUNG DER ERGEBNISSE | 14 |
| 11. | TYPISCHE WERTE..... | 15 |
| 12. | LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK | 15 |
| 13. | INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE | 16 |
| 14. | REFERENZ INTERVALLE..... | 16 |
| 15. | VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN | 16 |
| 16. | LITERATUR..... | 17 |
| 17. | ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS | 17 |

| | | |
|-----|--------------------------------------------|----|
| 1. | USO DEL KIT | 18 |
| 2. | INFORMAZIONI CLINICHE | 18 |
| 3. | PRINCIPIO DEL METODO | 18 |
| 4. | REATTIVI FORNITI..... | 19 |
| 5. | REATTIVI NON FORNITI..... | 19 |
| 6. | PREPARAZIONE DEI REATTIVI..... | 20 |
| 7. | CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI..... | 20 |
| 8. | RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI | 20 |
| 9. | METODO DEL DOSAGGIO | 21 |
| 10. | CALCOLO DEI RISULTATI | 22 |
| 11. | CARATTERISTICHE TIPICHE | 22 |
| 12. | CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO | 23 |
| 13. | CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO..... | 23 |
| 14. | INTERVALLI DI RIFERIMENTO | 24 |
| 15. | PRECAUZIONI PER L'USO | 24 |
| 16. | RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI..... | 25 |
| 17. | SCHEMA DEL DOSAGGIO | 26 |
| | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 28 |

1. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human Calcitonin (CT) in serum

2. CLINICAL BACKGROUND

A Biological activities

Calcitonin(CT) is a 32 amino acid peptide hormone secreted by the para-follicular C-cells of the thyroid gland under serum calcium control. After acute administration, this peptide acts as a potent hypocalcemic and hypophosphatemic hormone by increasing renal calcium clearance and reducing bone resorption. However, its precise physiological role in bone metabolism is not yet fully understood.

Various forms of CT may be detected in blood samples, including a CT monomer, an oxidized monomer, a dimer, higher molecular weight forms, and possibly precursor of CT. The concentrations of these peptides vary with clinical status, renal function and tissular origin of CT (normal or ectopic production). Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a malignant tumor, developed from the C-cells, secreting calcitonin in large excess. This disease occurs either as a sporadic (80%) or a familial (20%) form, which is transmitted as an autosomal dominant gene or as a component of multiple endocrine neoplasia (IIb).

Moderate hypercalcitoninemia is also observed in pregnancy, pernicious anaemia, renal failure and during the neonatal period. Preferably, monomer form of CT is detected in this assay.

B Clinical Application

The measurement of CT is used for :

- Diagnosis of medullary thyroid carcinoma (MTC),
- Follow up of malignant tumors, to check the success of surgery and to monitor for recurrence,
- Diagnosis of the preclinical cases of the familial forms of MTC (MEN II or Sipple syndrome) by the use of stimulation tests (calcium or pentagastrin),
- Study of the pathophysiology of the calcium-phosphate and bone metabolism.

3. PRINCIPLES OF THE METHOD

The Calcitonin ultra sensitive ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – human CT – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB ready for use) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the Calcitonin concentration. A calibration curve is plotted and Calcitonin concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

4. REAGENTS PROVIDED

| Reagents | 96 tests Kit | Reconstitution |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|
| SORB MT Microtiterplate with 96 anti CT (monoclonal antibodies) coated breakable wells | 96 wells | Ready for use |
| ENZ CONJ 50x Conjugate: HRP labelled anti-CT (monoclonal antibodies) in Stabilizing Buffer | 1 vial 0.125 ml | Dilute 50 x with conjugate buffer |
| ENZ CONJ DIL Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol | 1 vial 6 ml | Ready for use |
| CAL 0 - 5 LYO Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on QC data sheet) in CT-Free human serum | 6 vials lyophil. | Add 0.5 ml distilled water |
| SAM DIL LYO CT free human serum (to be used for samples dilution) with thymol | 1 vial lyophil. | Add buffer (see reconstitution volume on the QC data sheet) |
| BUF Buffer (serum free): borate buffer | 1 vial 8 ml | Ready for use |
| WASH SOLN 200x Wash Solution (Tris-HCl) | 1 vial 10 ml | Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer). |
| CONTROL 1 & 2 LYO Controls - N = 1 or 2 in human serum with gentamycin | 2 vials lyophil. | Add 0.5 ml distilled water |
| SUB TMB Chromogenic TMB solution (Tetramethylbenzidine) | 1 vial 12 ml | Ready for use |
| STOP SOLN Stop Solution: HCl: 1N | 1 vial 12 ml | Ready for use |

- Note:**
1. CT free human serum is to be used for samples dilution.
 2. 1 pg of our reference preparation is equivalent to 0.19 μ IU NIBSC 89/620.

5. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μ l, 100 μ l, 500 μ l and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Washer for microtiterplate
6. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading).

6. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators** : Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- B. Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- D. CT Free Serum**: Reconstitute the CT Free Serum with the amount of Buffer as indicated on the QC data sheet. Allow it to remain undisturbed until completely dissolved, and then mix well by gentle inversion.
- E. Working anti-CT-HRP conjugate**: Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding for example :40 µl of the 50 x concentrated anti-CT-HRP conjugate to 2 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.

7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused wells must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators, controls and CT free serum are very unstable and should be frozen immediately after use and kept at -20°C for 3 months. Only one freeze thawing cycle is allowed, discard the calibrators, controls and CT free serum after the second use.
- The concentrated Wash Solution is stable at 18-25°C until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the concentrated conjugate (50x) is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- The Working anti-CT-HRP conjugate is stable for 1 week at 4°C.
- The chromogenic TMB solution and the Stop Solution are stable at 2°C to 8°C until the expiry date.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at 18-25°C. It is recommended to vortex the samples before use.
- Do not use haemolysed samples.
- Do not use lipemic samples.

9. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- The chromogenic solution should be colourless. If a dark blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the preparation is unusable and must be discarded.
- Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
- During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

1. Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the wells into the holding frame.
3. Pipette 100 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 50 µl of Working anti-CT-HRP conjugate into all the wells.
5. Incubate for 18 ± 1 hour at 2-8°C.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at 18-25°C avoiding direct sunlight.
10. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
11. Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section 10.

10. CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. Plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of Calcitonin (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

11. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

| Calcitonin ultra sensitive ELISA | | Bichromatic model (OD) |
|----------------------------------|-----------|------------------------|
| Calibrator | 0 pg/ml | 0.009 |
| | 10 pg/ml | 0.029 |
| | 50 pg/ml | 0.127 |
| | 100 pg/ml | 0.447 |
| | 200 pg/ml | 0.919 |
| | 400 pg/ml | 1.87 |

12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**A. Detection Limit**

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.7 pg/ml.

B. Specificity

Some potentially interfering hormones have been tested in this assay. At concentrations up to 100 ng/ml, none of the following hormones showed significant interference :

- CGRP
- Salmon-calcitonin
- PDN 21
- Procalcitonin N terminal.

C. Precision

| Serum | INTRA ASSAY | | | INTER ASSAY | | | |
|-------|-------------|------------------|--------|-------------|---|------------------|--------|
| | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
| A | 19 | 43.0 ± 0.75 | 1.7 | A | 8 | 44.6 ± 2.1 | 4.9 |
| B | 19 | 133.7 ± 5.2 | 3.9 | B | 8 | 136.3 ± 8.1 | 6 |

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

| Added CT (pg/ml) | Recovered CT (pg/ml) | Recovery (%) |
|------------------|----------------------|--------------|
| 327.7 | 340.6 | 104 |
| 160.7 | 159.3 | 99 |
| 80.5 | 80.4 | 99 |
| 48.3 | 50.8 | 105 |

DILUTION TEST

| Sample | Dilution | Theoretical Concent. (pg/ml) | Measured Concent. (pg/ml) |
|---------|----------|------------------------------|---------------------------|
| Serum 1 | 1/1 | - | 300.6 |
| | 1/2 | 150.3 | 157.9 |
| | 1/4 | 75.1 | 75.5 |
| | 1/8 | 37.6 | 45.7 |
| | 1/16 | 18.8 | 25.2 |
| | 1/32 | 9.4 | 12.1 |
| | 1/64 | 4.7 | 5 |

Samples were diluted with CT Free Serum.

E. Hook effect

A sample spiked with CT up to 480000 pg/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

13. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the QC data sheet, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

14. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Normal values

84 samples from normal subjects obtained values below 11 pg/ml.

15. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl, the chromogenic solution contains TMB and H₂O₂. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

16. BIBLIOGRAPHY

1. GRAZE K., SPILER I.J., TASHIJAN A.H., MELVIN K.E.W., CERVI-SKINNER S., GAGEL R.F., MILLER H.H., WOLFE H.J., DELELLIS R.A., LEAPE L., FELDMAN Z.T. and REICHLIN S. (1978) **Natural history of familial medullary thyroid carcinoma; Effect of a program for early diagnosis.** Engl. J. Med., 299,18;980-985.
2. HENNESSY J.F., WELLS S.A., ONTJES D.A. and COOPER C.W. (1974) **A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:487-495.
3. ROUGIER Ph., CALMETTES C., LAPLANCHE A., TRAVAGLI J.P., LEFEVRE M., PARMENTIER C., MILHAUD G. and TUBIANA M. (1983) **the values of calcitonin and carcinoembryonic antigen in the treatment and management of nonfamilial medullary thyroid carcinoma.** Cancer, 51,5:856-862.
4. WALLACH S.R., ROYSTON I., TAETLE R., WOHL H. and DEFTOS L. (1981) **Plasma calcitonin as a marker of disease activity in patients with small cell carcinoma of the lung.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 53,3:602-606.
5. WELLS S.A., BAYLIN S.B., LINEHAN W.M., FARRELL R.E., COX E.B. and COOPER C.W. (1978) **Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland.** Ann. Surg., 188,2:139-141.
6. AURBACH G.D., MARX S.J. and SPIEGEL A.M. (1985) **Parathyroid hormone, calcitonin, and the calciferols.** In: Williams Textbook of endocrinology (7th edition; Wilson J.D. and Foster D.W. eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1137-1217.
7. BODY J.J. et al. (1987) **SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.** Excerpta Medica, 162-170.
8. NICOLI P. et al. (1995) **Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis.** Eur. J. Endocrinol. 132, 1, 75-81.
9. PACINI F. et al. (1994) **Routine measurement of serum calcitonin in nodular disease allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma.** J. Clin. Endocrinol. Metab. Excerpta Medica, 78, 4, 824-9.
10. QUESADA J. M. et al. (1994) **Calcitriol corrects deficient calcitonin secretion in the Vit. D deficient elderly.** J. Bone Miner Res. 9, 1, 53-57.

17. SUMMARY OF THE PROTOCOL

| | CALIBRATORS (μl) | SAMPLE(S) CONTROLS (μl) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Calibrators (0-5) Controls, Samples Working Anti-CT-HRP conjugate | 100 - 50 | - 100 50 |
| Incubate for 18 ± 1 hours at $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate. | | |
| Chromogenic TMB Solution | 100 | 100 |
| Incubate for 30 min at room temperature | | |
| Stop Solution | 100 | 100 |
| Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm) | | |

1. VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem Calcitonin (CT) in Serum.

2. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Calcitonin (CT) ist ein aus 32 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das unter Serum-Kalzium-Kontrolle von den parafollikulären Zellen (C-Zellen) der Schilddrüse gebildet wird. Nach akuter Administration agiert dieses Peptid als potentes hypocalcämisches und hypophosphatämisches Hormon, indem es die renale Kalzium-Clearance steigert und die Knochenresorption senkt. Seine genaue physiologische Rolle im Knochenstoffwechsel ist jedoch noch nicht völlig gesichert. In Blutproben können verschiedene Formen von CT gefunden werden, d. h. ein CT-Monomer, eine oxidierte Monomer-Form, ein Dimer sowie ein Vorläuferhormon mit höherer Molekülmasse. Die Konzentrationen dieser Peptide variieren je nach klinischem Status, Nierenfunktion und Gewebsherkunft des Calcitonins (normale oder ektopische Herkunft).

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MSK) ist ein bösartiger Tumor, der aus den C-Zellen gebildet wird und Calcitonin in großen Mengen freisetzt. Diese Erkrankung tritt als eine sporadische (80 %) oder als eine familiäre (20 %) Form auf, die durch autosomal dominante Vererbung oder als Bestandteil einer multiplen endokrinen Neoplasie (IIb) entstehen kann. Eine moderate Hypercalcitoninämie kann auch während der Schwangerschaft, bei einer perniziösen Anämie, einer Nierenfunktionsstörung und während der neonatalen Phase auftreten. In diesem Assay wird vor allem die Monomer-Form von CT festgestellt.

B. Klinische Anwendung

Indikationen für die Anwendung dieses CT-ELISA sind:

- die Diagnose des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MSK);
- die Erfolgskontrolle einer Operation sowie die Überwachung des Wiederauftretens eines MSK;
- die Diagnose von präklinischen familiären Formen von MSK (MEN II oder Sipple Syndrom) unter Verwendung von Stimulierungstestungen (Kalzium oder Pentagastrin);
- die Studie der Pathophysiologie des Kalziumphosphat- und Knochenstoffwechsels.

3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der Calcitonin ultra sensitive ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAK 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAK 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAK 1 – humanes Calcitonin - MAK 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (gebrauchsfertiges TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur Calcitoninkonzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die CT-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

| Reagenzien | 96 Test Kit | Rekonstitution |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| SORB MT Mikrotiterplatte mit 96 Anti-CT beschichteten brechbaren Wells (monoklonale Antikörper) | 96 Wells | gebrauchsfertig |
| ENZ CONJ 50x Konjugat: MRP (Meerrettich-Peroxidase) markierte Anti-CT (monoklonale Antikörper) in stabilisierendem Puffer. | 1 Gefäß 0,125 ml | 50 x mit Konjugatpuffer verdünnen |
| ENZ CONJ DIL Konjugatpuffer: TRIS-Maleate Puffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol | 1 Gefäß 6 ml | gebrauchsfertig |
| CAL 0 - 5 LYO Kalibrator - N = 0 bis 5 (genaue Werte auf QC Datenblatt) in CT-freiem Humanserum | 6 Gefäße lyophilisiert | 0,5 ml dest. Wasser zugeben |
| SAM DIL LYO CT-freies Humanserum (zur Verdünnung der Proben zu verwenden) mit thymol | 1 Gefäß lyophilisiert | Puffer zugeben (Rekonstitutionsvolumen siehe QC Datenblatt) |
| BUF Puffer (serumfrei): Boratpuffer | 1 Gefäß 8 ml | gebrauchsfertig |
| WASH SOLN 200x Waschlösung (Tris-HCl) | 1 Gefäß 10 ml | 200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen). |
| CONTROL 1 & 2 LYO Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mit Gentamycin | 2 Gefäße lyophilisiert | 0,5 ml dest. Wasser zugeben |
| SUB TMB Farblösung TMB (Tetramethylbenzidin) | 1 Gefäß 12 ml | gebrauchsfertig |
| STOP SOLN Stopplösung: HCL 1N | 1 Gefäß 12 ml | gebrauchsfertig |

Bemerkung: 1. Benutzen Sie das CT-freie Humanserum zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 0.19 µIU NIBSC 89/620.

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 500 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetrührer
5. Waschgerät für Mikrotiterplatten
6. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (bichromatische Auswertung)

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200 x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.
- D. CT-freies Serum:** Rekonstituieren Sie das CT-freie Serum mit der Puffermenge, die auf dem QC-Datenblatt angegeben ist. Bis zum Auflösen ruhig stehen lassen, danach durch sanfte Inversion gründlich mischen.
- E. Gebrauchsfertiges Anti-CT-MRP-Konjugat:** Bereiten Sie ein entsprechendes Volumen an Konjugat zu, indem Sie zum Beispiel 40µl des 50 fach konzentrierten Anti-CT-MRP Konjugats zu 2 ml Konjugatpuffer geben. Es wird empfohlen, die Lösung frisch zuzubereiten.

7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nicht verwendete Wells sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Kalibratoren und Kontrollen rekonstituiert und Serum ohne CT sind instabil und sollten sofort verwendet werden. Aliquotiert können sie bei –20°C 3 Monate lang gelagert werden. Die Kalibratoren und Kontrollen sollten nur einmal eingefroren werden, nach der zweiten Verwendung sind die Kalibratoren, Kontrollen und CT-freies Serum zu entsorgen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei 18-25°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das konzentrierte Konjugat (50x) bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Das gebrauchsfertige Anti-CT-MRP-Konjugat ist bei 4°C 1 Woche haltbar.
- Die TMB-Farblösung und die Stopplösung sind bei 2°C bis 8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

8. PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben 18-25°C erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Keine hämolytischen Proben benutzen.
- Keine lipämischen Proben benutzen.

9. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der Farblösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie die Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der Farblösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Wells für den Lauf aus. Nicht verwendete Wells sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Wells im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
4. Pipettieren Sie 50 µl des gebrauchsfertigen Anti-CT-MRP Konjugat in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 18 ± 1 Stunde bei 2 – 8°C.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7. Waschen Sie die Platte 3 mal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
 - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
8. Pipettieren Sie 100 µl der Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei 18-25°C; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
10. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
11. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb von 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt 10 beschrieben.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie den c.p.m. für jeden Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration CT (Abszisse) ein und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

11. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

| Calcitonin ultra sensitive ELISA | | Bichromatisches Modell (OD) |
|-------------------------------------|-----------|--------------------------------|
| Kalibrator | 0 pg/ml | 0,009 |
| | 10 pg/ml | 0,029 |
| | 50 pg/ml | 0,127 |
| | 100 pg/ml | 0,447 |
| | 200 pg/ml | 0,919 |
| | 400 pg/ml | 1,87 |

12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,7 pg/ml.

B. Spezifität

Einige potenziell interferierende Hormone wurden in diesem Assay getestet. Bei Konzentrationen bis zu 100 ng/ml zeigte keines der folgenden Hormone eine signifikante Interferenz:

- cGRP
- Lachs-Calcitonin
- PDN 21
- Procalcitonin N-terminal.

C. Präzision

| Serum | INTRA ASSAY | | | INTER ASSAY | | | |
|-------|-------------|---------------------|-----------|-------------|---|---------------------|-----------|
| | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
| A | 19 | 43,0 ± 0,75 | 1,7 | A | 8 | 44,6 ± 2,1 | 4,9 |
| B | 19 | 133,7 ± 5,2 | 3,9 | B | 8 | 136,3 ± 8,1 | 6 |

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

| Probe | Zugeg. CT (pg/ml) | Wiedergef. CT (pg/ml) | Wiedergefunden (%) |
|-------|----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Serum | 327,7 | 340,6 | 104 |
| | 160,7 | 159,3 | 99 |
| | 80,5 | 80,4 | 99 |
| | 48,3 | 50,8 | 105 |

VERDÜNNUNGSTEST

| Probe | Verdünn. | Theoret. Konzentr. (pg/ml) | Gemess. Konzentr. (pg/ml) |
|---------|----------|-------------------------------|------------------------------|
| Serum 1 | 1/1 | - | 300,6 |
| | 1/2 | 150,3 | 157,9 |
| | 1/4 | 75,1 | 75,5 |
| | 1/8 | 37,6 | 45,7 |
| | 1/16 | 18,8 | 25,2 |
| | 1/32 | 9,4 | 12,1 |
| | 1/64 | 4,7 | 5 |

Die Proben wurden mit CT-freiem Humanserum verdünnt.

F. Hook-Effekt

Eine Probe mit CT bis zu 480000 pg/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf dem QC-Datenblatt angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

14. REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Normalwerte

84 Proben von gesunden Personen ergaben Werte unter 11 pg/ml.

15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serumproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält HCl, Farblösung enthält TMB und H₂O₂. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

16.LITERATUR

1. GRAZE K., SPILER I.J., TASHIJAN A.H., MELVIN K.E.W., CERVI-SKINNER S., GAGEL R.F., MILLER H.H., WOLFE H.J., DELELLIS R.A., LEAPE L., FELDMAN Z.T. and REICHLIN S. (1978) **Natural history of familial medullary thyroid carcinoma; Effect of a program for early diagnosis.** Engl. J. Med., 299,18;980-985.
2. HENNESSY J.F., WELLS S.A., ONTJES D.A. and COOPER C.W. (1974) **A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:487-495.
3. ROUGIER Ph., CALMETTES C., LAPLANCHE A., TRAVAGLI J.P., LEFEVRE M., PARMENTIER C., MILHAUD G. and TUBIANA M. (1983) **the values of calcitonin and carcinoembryonic antigen in the treatment and management of nonfamilial medullary thyroid carcinoma.** Cancer, 51,5:856-862.
4. WALLACH S.R., ROYSTON I., TAETLE R., WOHL H. and DEFTOS L. (1981) **Plasma calcitonin as a marker of disease activity in patients with small cell carcinoma of the lung.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 53,3:602-606.
5. WELLS S.A., BAYLIN S.B., LINEHAN W.M., FARRELL R.E., COX E.B. and COOPER C.W. (1978) **Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland.** Ann. Surg., 188,2:139-141.
6. AURBACH G.D., MARX S.J. and SPIEGEL A.M. (1985) **Parathyroid hormone, calcitonin, and the calciferols.** In: williams Textbook of endocrinology (7th edition; Wilson J.D. and foster D.W. eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1137-1217.
7. BODY J.J. et al. (1987) **SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.** Excerpta Medica, 162-170.
8. NICOLI P. et al. (1995) **Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis.** Eur. J. Endocrinol. 132, 1, 75-81.
9. PACINI F. et al. (1994) **Routine measurement of serum calcitonin in modular disease allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma.** J. Clin. Endocrinol. Metab. Excerpta Medica, 78, 4, 824-9.
10. QUESADA J. M. et al. (1994) **Calcitriol corrects deficient calcitonin secretion in the Vit. D deficient elderly.** J. Bone Miner Res. 9, 1, 53-57.

17.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

| | KALIBRATOREN (µl) | PROBE(N) KONTROLLEN (µl) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|
| Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Gebrauchsfertiges Anti-CT-MRP-Konjugat | 100 - 50 | - 100 50 |
| 18 ± 1 Stunde bei 2 – 8°C inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. 3 mal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen. | | |
| Farblösung | 100 | 100 |
| 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren. | | |
| Stopplösung | 100 | 100 |
| Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken. | | |

1. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro della calcitonina umana (CT) in siero.

2. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

La calcitonina (CT) è un ormone polipeptidico a 32 amminoacidi secreto dalle cellule C parafollicolari della ghiandola tiroide sotto il controllo del calcio del siero. A seguito di una somministrazione acuta, tale peptide agisce come un potente ormone ipocalcemicico e ipofosfatemico aumentando la capacità di clearance del calcio renale e riducendo il riassorbimento osseo. Tuttavia non è stato ancora pienamente compreso il preciso ruolo fisiologico da essa svolto nel metabolismo osseo.

Nei campioni di sangue è stato possibile riscontrare diverse forme di CT, incluso un monomero CT, un monomero ossidato, un dimero, forme ad elevato peso molecolare e possibili precursori della CT. La concentrazione di questi peptidi varia a seconda dello stato clinico, della funzione renale e dell'origine tissulare di CT (produzione normale o ectopica). Il carcinoma tiroideo midollare (MTC) è un tumore maligno sviluppato dalle cellule C che comporta la secrezione di un notevole eccesso di calcitonina. Tale patologia si presenta in forma sporadica (80%) o familiare (20%) trasmessa come gene dominante autosomico o come componente di una neoplasia endocrina multipla (IIb). Una moderata ipercalcitoninemia si riscontra inoltre in gravidanza, in caso di anemia perniziosa, disfunzione renale e durante il periodo neonatale. In questo dosaggio è stata preferibilmente rilevata la forma monomerica di CT.

B. Applicazioni cliniche

La misurazione di CT tramite il presente ELISA viene utilizzata per:

- la diagnosi del carcinoma tiroideo midollare (MTC)
- il follow-up dei tumori maligni, al fine di verificare il successo dell'intervento chirurgico oppure per monitorare una recidiva
- la diagnosi dei casi preclinici di forme familiari di MTC (MEN II o sindrome di Sipple) utilizzando i test di stimolazione (calcio o pentagastrina)
- lo studio della fisiopatologia del fosfato di calcio e del metabolismo osseo.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Calcitonin ultra sensitive ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento – CT umana – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. La soluzione cromogenica (TMB pronta all'uso) viene aggiunta e incubata. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Stop Solution; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di CT. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione CT nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

4. REATTIVI FORNITI

| Reattivi | Kit da 96 test | Volume di ricostituzione |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------|
| SORB MT Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti-CT (anticorpi monoclonali) | 96 pozzetti | Pronte per l'uso |
| ENZ CONJ 50x Coniugato: marcato HRP anti-CT (Anticorpi monoclonali) in tampone stabilizzante | 1 fialone 0,125 ml | Diluire 50 x con buffer coniugato |
| ENZ CONJ DIL Buffer coniugato: tampone TRIS-Maleate con BSA, EDTA e timolo | 1 fialone 6 ml | Pronte per l'uso |
| CAL 0 - 5 LYO Calibratore 0-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle QC data sheet), in siero umano privo di CT | 6 fialoni liofiliz. | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata |
| SAM DIL LYO Siero umano privo di CT (da utilizzare per la diluizione dei campioni) contenente thymol | 1 fialone lyophil. | Aggiungere buffer (per il volume si veda QC data sheet) |
| BUF Buffer (privo di siero): buffer borato | 1 fialone 8 ml | Pronte per l'uso |
| WASH SOLN 200x Tampone di lavaggio (TRIS HCl) | 1 fialone 10 ml | Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico |
| CONTROL 1 & 2 LYO Controlli: N = 1 o 2, in siero umano contenente gentamicina | 2 fialoni liofiliz. | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata |
| SUB TMB Soluzione cromogena TMB (Tetrametilbenzidina) | 1 fialone 12 ml | Pronte per l'uso |
| STOP SOLN Soluzione di arresto: HCl 1N | 1 fialone 12 ml | Pronte per l'uso |

Note: 1. Usare siero umano privo di calcitonina per diluire i campioni.
2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 0.19 μ IU NIBSC 89/620.

5. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 μ l, 100 μ l, 500 μ l e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. lavatrice per piastra di microtitolazione
6. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di 450 nm e 650 nm (lettura bicromatica)

6. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.
- D. Siero privo di CT:** Ricostituire il Siero privo di CT con la quantità di Buffer indicata sull' QC data sheet. Non manipolare il prodotto fino alla completa dissoluzione, quindi miscelare bene capovolgendolo delicatamente.
- E. Coniugato anti-CT-HRP attivo:** Preparare la quantità necessari a di soluzione del coniugato aggiungendo per esempio : 40 µl di anti-CT coniugato con HRP (concentrato x 50) a 2 ml di tampone del coniugato (buffer coniugato). Si raccomanda una diluizione estemporanea.

7. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta..
- I pozzetti inutilizzati devono essere conservati a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- **Una volta eseguita la ricostituzione** è necessario congelare i calibratori, i controlli e il siero privo di calcitonina subito dopo l'uso e conservarli a -20° C per 3 mesi poiché sono instabili. È consentito un solo ciclo di congelamento-scongelo, dopo il secondo utilizzo smaltire i calibratori, i controlli e il siero privo di calcitonina.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a 18-25°C fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato concentrato (50x) è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Il coniugato anti-CT-HRP attivo è stabile per 1 settimana a 4°C.
- La soluzione cromogena TMB e la Soluzione di arresto sono stabili a 2°C - 8°C fino alla data di scadenza.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Non usare campioni emolizzati.
- Non utilizzare campioni lipemici.

9. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

- Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
- Non mescolare reattivi di lotti diversi.
- Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
- Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
- Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
- Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
- Per la distribuzione della Soluzione cromogena e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
- L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
- Rispettare i tempi di incubazione.
- Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.
- Distribuzione della Soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
- Durante l'incubazione con la Soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di pozzetti necessario per il test. I pozzetti inutilizzati devono essere risigillati nel contenitore con un essiccante e conservati a 2-8°C.
2. Assicurare le i pozzetti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 100 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 50 µl di coniugato anti-CT-HRP attivo in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 18 ± 1 ore a 2-8°C.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a 18-25°C; evitare la luce diretta del sole.
10. Pipettare 100 µl di Soluzione di arresto in ogni pozzetto.
11. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 1 ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

10. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di CT, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametr

11. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di insulina in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

| Calcitonin ultra sensitive ELISA | | Unità OD modello Bicromatico |
|---------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------|
| Calibratore | 0 pg/ml | 0,009 |
| | 10 pg/ml | 0,029 |
| | 50 pg/ml | 0,127 |
| | 100 pg/ml | 0,447 |
| | 200 pg/ml | 0,919 |
| | 400 pg/ml | 1,87 |

12. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO**A. Sensibilità**

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard.

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,7 pg/ml.

B. Specificità

In questo dosaggio sono stati testati alcuni ormoni potenzialmente interferenti. A concentrazioni fino a 100 ng/ml, nessuno dei seguenti ormoni ha dimostrato di esercitare un'interferenza degna di nota:

- CGRP
- Calcitonina di salmone
- PDN 21
- Procalcitonina N terminale.

C. Precisione

| INTRA SAGGIO | | | | INTER SAGGIO | | | |
|--------------|----|------------------|--------|--------------|---|------------------|--------|
| Siero | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Siero | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
| A | 19 | 43,0 ± 0,75 | 1,7 | A | 8 | 44,6 ± 2,1 | 4,9 |
| B | 19 | 133,7 ± 5,2 | 3,9 | B | 8 | 136,3 ± 8,1 | 6 |

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza**TEST DI DILUIZIONE**

| Campione | Diluizione | Conc. teorica (pg/ml) | Conc. misurata (pg/ml) |
|----------|------------|-----------------------|------------------------|
| Siero | 1/1 | - | 300,6 |
| | 1/2 | 150,3 | 157,9 |
| | 1/4 | 75,1 | 75,5 |
| | 1/8 | 37,6 | 45,7 |
| | 1/16 | 18,8 | 25,2 |
| | 1/32 | 9,4 | 12,1 |
| | 1/64 | 4,7 | 5 |

I campioni sono stati diluiti con siero umano privo di calcitonina

TEST DI RECUPERO

| Campione | CT aggiunta (pg/ml) | CT recuperata (pg/ml) | Recupero (%) |
|----------|---------------------|-----------------------|--------------|
| Siero | 327,7 | 340,6 | 104 |
| | 160,7 | 159,3 | 99 |
| | 80,5 | 80,4 | 99 |
| | 48,3 | 50,8 | 105 |

E. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta insulina fino a 480000 pg/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull' QC data sheet, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

14.INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, per cui ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Valori normali

84 campioni dagli oggetti normali hanno ottenuto i valori inferiore a 11 pg/ml.

15.PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti. La Stop solution contiene HCl, il cromogeno contiene TMB e H₂O₂. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.












16.RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. GRAZE K., SPILER I.J., TASHIJAN A.H., MELVIN K.E.W., CERVI-SKINNER S., GAGEL R.F., MILLER H.H., WOLFE H.J., DELELLIS R.A., LEAPE L., FELDMAN Z.T. and REICHLIN S. (1978) **Natural history of familial medullary thyroid carcinoma; Effect of a program for early diagnosis.** Engl. J. Med., 299,18;980-985.
2. HENNESSY J.F., WELLS S.A., ONTJES D.A. and COOPER C.W. (1974) **A comparison of pentagastrin injection and calcium infusion as provocative agents for the detection of medullary carcinoma of the thyroid.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:487-495.
3. ROUGIER Ph., CALMETTES C., LAPLANCHE A., TRAVAGLI J.P., LEFEVRE M., PARMENTIER C., MILHAUD G. and TUBIANA M. (1983) **the values of calcitonin and carcinoembryonic antigen in the treatment and management of nonfamilial medullary thyroid carcinoma.** Cancer, 51,5:856-862.
4. WALLACH S.R., ROYSTON I., TAETLE R., WOHL H. and DEFTOS L. (1981) **Plasma calcitonin as a marker of disease activity in patients with small cell carcinoma of the lung.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 53,3:602-606.
5. WELLS S.A., BAYLIN S.B., LINEHAN W.M., FARRELL R.E., COX E.B. and COOPER C.W. (1978) **Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland.** Ann. Surg., 188,2:139-141.
6. AURBACH G.D., MARX S.J. and SPIEGEL A.M. (1985) **Parathyroid hormone, calcitonin, and the calciferols.** In: williams Textbook of endocrinology (7th edition; Wilson J.D. and foster D.W. eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1137-1217.
7. BODY J.J. et al. (1987) **SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.** Excerpta Medica, 162-170.
8. NICOLI P. et al. (1995) **Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis.** Eur. J. Endocrinol. 132, 1, 75-81.
9. PACINI F. et al. (1994) **Routine measurement of serum calcitonin in nodular disease allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma.** J. Clin. Endocrinol. Metab. Excerpta Medica, 78, 4, 824-9.
10. QUESADA J. M. et al. (1994) **Calcitriol corrects deficient calcitonin secretion in the Vit. D deficient elderly.** J. Bone Miner Res. 9, 1, 53-57.

17.SCHEMA DEL DOSAGGIO

| | CALIBRATORE (μl) | CAMPIONI CONTROLLI (μl) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Calibratore (0 - 5) | 100 | - |
| Campioni, controlli | - | 100 |
| Coniugato anti-CT-HRP attivo | 50 | 50 |
| Incubare per 18 ± 1 ore a $2-8^{\circ}\text{C}$. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μ l di soluzione di lavaggio e aspirare. | | |
| Soluzione cromogena | 100 | 100 |
| Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. | | |
| Soluzione di arresto | 100 | 100 |
| Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm) | | |

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Française | Espanol | Italiano |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|
|  | European Conformity | CE-Konformitäts-kennzeichnung | Conforme aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las Instrucciones | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | utilisation Diagnostic in vitro | Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Référence | Número de catálogo | No. di catalogo |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | No. de lot | Número de lote | Lotto no |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta y advertencias precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température de conservation | Temperatura de conservación | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| <i>Distributed by</i> | Distributed by | Vertrieb durch | Distribution par | Distribución por | Distribuzione da parte di |
|  | Version | Version | Version | Versión | Versione |
|  | Single-use | Einmalverwendung | À usage unique | Uso único | Uso una volta |