



IVD

CE

# CT-U.S.-ELISA

*KAP0421*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b> <b>230123</b>
New logo

Read entire protocol before use.

## CT-U.S.-ELISA

### I. INTENDED USE

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

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource CT-U.S.-ELISA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP0421 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
**Tel : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. 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.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource CT-U.S.-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.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution			
 Microtiterplate with 96 anti CT (monoclonal antibodies) coated breakable wells	96 wells	blue	<b>Ready for use</b>			
<table border="1" data-bbox="71 817 295 862"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugate: HRP labelled anti-CT (monoclonal antibodies) in Stabilizing Buffer	Ab	HRP	CONC	1 vial 0.125 ml	yellow	<b>Dilute 50 x</b> with conjugate buffer
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 940 231 985"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	CONJ	BUF	1 vial 6 ml	red	<b>Ready for use</b>	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1064 215 1108"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in CT-Free human serum	CAL	N	6 vials lyophil.	yellow	<b>Add 0.5 ml</b> distilled water	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1209 151 1254"> <tr> <td>SERUM</td> </tr> </table> CT free human serum (to be used for samples dilution) with thymol	SERUM	1 vial lyophil.	black	<b>Add buffer</b> (see reconstitution volume on the label)		
SERUM						
<table border="1" data-bbox="71 1310 151 1355"> <tr> <td>BUF</td> </tr> </table> Buffer (serum free): borate buffer	BUF	1 vial 8 ml	black	<b>Ready for use</b>		
BUF						
<table border="1" data-bbox="71 1411 263 1456"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	<b>Dilute 200 x</b> with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1500 239 1545"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human serum with gentamycin	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	<b>Add 0.5 ml</b> distilled water	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1612 223 1657"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogenic TMB solution (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	brown	<b>Ready for use</b>	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="71 1736 215 1780"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stop Solution: HCl: 1N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	white	<b>Ready for use</b>	
STOP	SOLN					

**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 µIU NIBSC 89/620.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- 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.
- CT Free Serum**: Reconstitute the CT Free Serum with the amount of Buffer as indicated on the vial label. Allow it to remain undisturbed until completely dissolved, and then mix well by gentle inversion.
- 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.

#### VIII. 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.

#### IX. 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.

#### X. 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

- 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.
- Secure the wells into the holding frame.
- Pipette 100 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Pipette 50 µl of Working anti-CT-HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 18 ± 1 hour at 2-8°C.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
  - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
  - Aspirating the content of each well
- Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 30 minutes at 18-25°C avoiding direct sunlight.
- Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
- Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI.

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

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

#### XII. TYPICAL DATA

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

CT-US.-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

#### XIII. 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

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	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.

#### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, 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.

#### XV. 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.

#### XVI. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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.

**XVII. 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 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.

**XVIII. 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°C. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic TMB Solution	100	100
Incubate for 30 min at 18-25°C		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## CT-U.S.-ELISA

### I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immunoenzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de la Calcitonine humaine (CT) dans le sérum.

### II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource CT-U.S.-ELISA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP0421 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Pour une assistance technique ou une information sur une commande :**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11**

**Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. CONTEXTE CLINIQUE

#### A. Activités biologiques

La Calcitonine (CT) est une hormone peptidique 32 acides aminés sécrétée par les cellules C parafolliculaires de la glande thyroïde sous contrôle de calcium sérique. Après une administration aiguë ce peptide se comporte comme une hormone hypocalcémiante et hypophosphatémique puissante en augmentant l'élimination rénale de calcium et en réduisant la résorption osseuse. Cependant, son rôle physiologique exact dans le métabolisme osseux n'est pas encore compris entièrement. Différentes formes de CT peuvent apparaître dans les échantillons sanguins, y compris un monomère CT, un monomère oxydé, un dimère, des formes avec un poids moléculaire plus élevé, et précurseur de CT possible. Les concentrations de ces peptides varient avec la situation clinique, la fonction rénale et l'origine tissulaire de CT (production normale ou ectopique). Le carcinome thyroïde médullaire (MTC) est une tumeur maligne, développé à partir des cellules C, sécrétant excessivement de la calcitonine. Cette maladie apparaît comme forme sporadique (80%) ou familiale (20%), qui est transmise comme un gène autosomique dominant ou comme un composant du néoplasme endocrine multiple (IIb). La hypercalcitoninémie modérée apparaît aussi pendant la grossesse, l'anémie pernicieuse, le dysfonctionnement rénal et la période néonatale. De préférence, la forme monomère de CT est analysée dans ce test.

#### B. Application clinique

La mesure de CT est utilisée pour :

- diagnostic de carcinome thyroïde médullaire (MTC)
- suivi de tumeurs malignes, pour vérifier le succès de la chirurgie et la possibilité de rechute.
- diagnostic des cas précliniques des formes familiales de MTC (MEN II ou syndrome de Sipple) par l'utilisation de tests de stimulation.
- Etude de la pathophysiologie du métabolisme phosphocalcique et osseux.



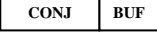
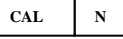



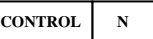
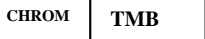
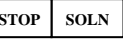


#### IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Le kit DIASource CT-U.S.-ELISA est un « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectué sur des microplaques. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture monoclonal (MAb 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (MAb 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich: MAb 1 recouvert – CT – MAb 2 – HRP, la microplaque est lavée afin d'enlever l'anticorps libre marqué enzymatiquement. L'anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB – Prêt à l'emploi) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la microplaque est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en CT.

Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en CT dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration.

#### V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Microplaque de titration cassable avec 96 puits tapissés d'anti-CT (anticorps monoclonal)	96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
 Conjugué: anti-CT marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon stabilisant	1 flacon 0,125 ml	jaune	Diluer 50 x avec le tampon du conjugué
 Tampon du conjugué: un tampon TRIS-Maléate avec de l'albumine bovine, EDTA et du thymol	1 flacon 6 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
 Calibrateur N = 0 à 5 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain libre de CT	6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Sérum humain libre de CT (à utiliser pour la dilution des échantillons) avec du thymol	1 flacon lyophilisé	noir	Ajouter le tampon (cf. volume exact sur chaque flacon)
 Tampon (sans sérum): tampon borate	1 flacon 8 ml	Noir	Prêt à l'emploi
 Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et de la gentamycine	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Solution Chromogénique (Tétraméthylbenzidine)	1 flacon 12 ml	Brun	Prêt à l'emploi
 Solution d'arrêt: HCl 1N	1 flacon 12 ml	Noir	Prêt à l'emploi

Note: 1. Utiliser le sérum humain libre de CT pour la dilution des échantillons.  
2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 0.19 µIU NIBSC 89/620.

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée d'une haute qualité
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 500 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Laveur de microplaques
6. Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée..
- B. Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.
- D. Sérum sans CT:** Reconstituer le sérum sans CT avec la quantité de tampon indiquée sur l'étiquette du flacon. Laisser reposer jusqu'à dissolution complète, mélanger ensuite en retournant doucement le flacon.
- E. Conjugué anti-CT-HRP de travail: Préparer un volume adéquat de solution de conjugué en ajoutant, par exemple, 40 µl du conjugué anti-CT-HRP 50 x concentré à 2 ml de tampon du conjugué.** Il est recommandé de faire une dilution extemporanée.

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des puits inutilisés doivent être gardés, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccant jusqu'à la date d'expiration.
- Après la reconstitution, les calibrateurs, les contrôles et le sérum libre de CT doivent être congelés immédiatement après l'usage et gardés -20°C pendant 3 mois car ils sont instables. Un seul cycle de congélation et décongélation est permis, jeter les calibrateurs, les contrôles et le sérum libre de CT après le deuxième usage.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à 18-25°C jusqu'à la date d'expiration.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le conjugué concentré (50x) est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Le conjugué anti-CT-HRP de travail est stable une semaine à 4°C.
- La solution chromogénique TMB et la solution d'arrêt sont stables entre 2°C et 8°C jusqu'à la date de péremption.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage en aliquots à -20°C est recommandé. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être amenés à 18-25°C. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés
- Ne pas utiliser des échantillons lipémiqes.

#### X. MODE OPERATOIRE

- A. Notes de manipulation**  
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.  
Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.  
Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la Solution de Lavage.  
Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.  
Pour la distribution de la Solution Chromogénique et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

Distribuer la Solution Chromogénique dans les 15 minutes après le lavage de la microplaque de titration.

Éviter l'exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la Solution Chromogénique

#### B. Mode opératoire

- Sélectionner le nombre de puits nécessaires pour le test. Les puits inutilisés doivent être cachetés de nouveau dans le sachet avec un dessiccant et gardés à 2-8°C.
- Placer les puits dans le support.
- Pipeter 100 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
- Pipeter 50 µl du conjugué anti-CT-HRP de travail dans tous les puits.
- Incuber pendant 18 ± 1 heures à 2-8°C
- Aspirer le liquide de chaque puits.
- Laver la plaque 3 fois en:
  - distribuant 0,4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
  - aspirant le contenu de chaque puits
- Pipeter 100 µl de la Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
- Incuber la microplaque pendant 30 minutes à 18-25°C, éviter l'exposition à la lumière du soleil.
- Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
- Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans 1 heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

#### XI. CALCUL DES RESULTATS

- Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Dessiner les DO (densité optique) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en CT et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration.
- Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

#### XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe d'étalonnage.

CT-U.S.-ELISA		Unités DO modèle bichromatique
Calibrateur	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

#### XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

##### A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,7 pg/ml.

##### B. Spécificité

Certaines hormones pouvant potentiellement interférer avec l'analyse ont été testées dans cet essai. A des concentrations jusqu'à 100 ng/ml, aucune des hormones suivantes ne montre une interférence significative :

- CGRP
- Calcitonine de saumon
- PDN 21
- Procalcitonine N terminale.

#### C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Sérum	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 : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

#### D. Exactitude

##### TEST DE RECUPERATION

CT ajoutée (pg/ml)	CT récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
327,7	340,6	104
160,7	159,3	99
80,5	80,4	99
48,3	50,8	105

##### TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
Sérum 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

Les échantillons ont été dilués avec le sérum humain libre de CT.

#### E. Effet crochet

Un échantillon dopé avec de la CT jusqu'à 480000 pg/ml donne des DO supérieures au dernier point de calibration.

#### XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azide influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs *in duplo* des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôles de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement le lissage de la courbe sélectionné par l'ordinateur.

#### XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

##### Valeurs normales

84 échantillons de sujets normaux ont donné des valeurs inférieures à 11 pg/ml.

## XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Eviter le contact de la peau avec tous les réactifs. La Solution d'arrêt contient de l'HCl, la Solution Chromogénique contient de la TMB et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

## XVII. BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.
- 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.

## XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Calibrateurs (0-5) Echantillons , Contrôles Conjugué Anti-CT-HRP de travail	100 - 50	- 100 50
Incuber pendant 18 ± 1 heures à 2 – 8°C Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution Chromogénique	100	100
Incuber pendant 30 min à 18-25°C.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de microplaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm)		

Lees het hele protocol vóór gebruik.

# CT-U.S.-ELISA

## I. *BEOOGD GEBRUIK*

Immunoenzymetrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van humaan Calcitonine (CT) in serum.

## II. *ALGEMENE INFORMATIE*

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource CT-U.S.-ELISA Kit
- B. **Catalogusnummer:** KAP0421: 96 tests
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

**Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:  
Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91**

## III. *KLINISCHE ACHTERGROND*

### A **Biologische activiteiten**

Calcitonine (CT) is een 32 aminozuur peptide hormoon afgescheiden door de para-folliculaire C-cellen van de schildklier onder de controle van serumcalcium. Na acute toediening gedraagt deze peptide zich als een krachtig hypocalciëemisch en hypofosfatemisch hormoon door het verhogen van de calciumopruiming in de nieren en het verlagen van de beenderresorptie. Nochtans is zijn precieze fysiologische rol in het beendermetabolisme nog niet volledig doorgrond. Verschillende vormen van CT kunnen gedetecteerd worden in bloedstalen, waaronder een CT-monomeer, een geoxideerd monomeer, een dimeer, vormen met een hoger moleculair gewicht, en mogelijk precursor voor CT. De concentraties van deze peptiden variëren met de klinische status, de nierfunctie en de weefseloorsprong van CT (normale of ectopische produktie). Medulair schildkliercarcinoom (MTC) is een kwaadaardige tumor, ontwikkeld vanuit de C-cellen, dat in grote overdaad calcitonine afscheidt. Deze ziekte komt hetzij onder een sporadische (80%) hetzij als een familiale (20%) vorm voor, die wordt doorgegeven als een autosomaal dominant gen of als een component van multipel endocrien neoplasma (IIB). Gematigde hypercalcitoninemie komt ook voor bij zwangerschap, pernicieuze anemie, disfunctie van de nier en tijdens de neonatale periode. Bij voorkeur wordt de monomere vorm van CT gedetecteerd in deze test.

### B. **Klinische toepassing**

De meting van CT door de huidige IRMA wordt gebruikt voor:


- diagnose van medulair schildkliercarcinoom (MTC).
- opvolging van kwaadaardige tumoren, om het succes van chirurgie en hervalling na te gaan.
- diagnose van medulair schildkliercarcinoom (MTC).
- diagnose van de pre-klinische gevallen van de familiale vormen van MTC (MEN II of Sipple syndroom) door het gebruik van stimulatietesten (calcium of pentagastrine)
- studie van de pathofysiologie van het calcium-fosfaat- en beendermetabolisme.

#### IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

De DIASource CT-U.S.-ELISA is een "Solid Phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay" uitgevoerd op microtiterplaten. De kalibrators en de monsters reageren met het monoklonale vangantilichaam (MAB 1) gecoat op de microtiterputje en met een monoklonaal antilichaam (MAB 2) gelabelled met mieraikswortelperoxidase (HRP). Na een incubatieperiode die de vorming toelaat van een sandwich: gecoate MAB 1 – humaan CT – MAB 2 – HRP, wordt de microtiterplaat gewassen om het ongebonden antilichaam dat gelabelled is met een enzyme te verwijderen. Het gebonden antilichaam dat gelabelled is met een enzyme wordt gemeten door een chromogene reactie. Een chromogene oplossing (gebruiksklare TMB) wordt toegevoegd en geïncubeerd. De reactie wordt beëindigd door toevoeging van de Stopoplossing en de microtiterplaat wordt dan gelezen op de gepaste golflengte. De hoeveelheid substraatturnover wordt colorimetrisch bepaald door de meting van de absorbantie, die proportioneel is met de Calcitonine concentratie.

Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de Calcitonineconcentratie in de monsters wordt bepaald door interpolatie van de kalibratiecurve.

#### V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 Microtiterplaat met 96 anti CT (monoklonale antilichamen) gecoate breekbare putjes	96 wells	blauw	<b>Klaar</b> voor gebruik			
<table border="1" data-bbox="76 840 300 880"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugaat: Anti-CT (monoklonale antilichamen) gelabeld met HRP in stabiliserende buffer	Ab	HRP	CONC	1 flacon 0,125 ml	geel	50 x met conjugaat buffer <b>verdunnen</b> .
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 992 236 1032"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugaat buffer: TRIS-Maleate buffer met bovien serumalbumine, EDTA en thymol	CONJ	BUF	1 flacon 6 ml	rood	<b>Klaar</b> voor gebruik	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1144 212 1184"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibrator - N = 0 tot 5 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in calcitonine-vrij humaan serum	CAL	N	6 flacons gevries-droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water <b>toevoegen</b>	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1296 156 1337"> <tr> <td>SERUM</td> </tr> </table> CT-vrij humaan serum (te gebruiken voor verdunning van de stalen) met thymol	SERUM	1 flacon lyophil.	zwart	<b>Voeg</b> buffer toe (zie volume op het etiket)		
SERUM						
<table border="1" data-bbox="76 1420 156 1460"> <tr> <td>BUF</td> </tr> </table> Buffer (serum vrij): boraat buffer	BUF	1 flacon 8 ml	zwart	<b>Klaar</b> voor gebruik		
BUF						
<table border="1" data-bbox="76 1516 268 1556"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wasoplossing (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	200 x met gedestilleerd water <b>verdunnen</b> (gebruik een magnetische roerder).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1612 239 1653"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 of 2 in humaan serum en gentamycine	CONTROL	N	2 flacons, gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water <b>toevoegen</b>	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1753 220 1794"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogene Oplossing TMB (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 flacon 12 ml	bruin	<b>Klaar</b> voor gebruik	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="76 1861 212 1901"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stopoplossing: HCl 1N	STOP	SOLN	1 flacon 12 ml	wit	<b>Klaar</b> voor gebruik	
STOP	SOLN					

Opmerking: 1. Gebruik CT-vrij humaan serum voor monsterverdunningen.  
2. 1 pg van de kalibratorbereiding is gelijk aan 0.19 µIU NIBSC 89/620.

#### VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 µl, 100 µl, 500 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Vortexmenger.
4. Magnetische roerder.
5. Wasser voor de Microtiterplaten
6. Microtiterplaatlezer in staat tot lezen bij 450 nm en 650 nm (bichromatische lezing)

#### VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. Kalibrators:** Reconstitueer de kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B. Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. CT-vrij serum :** Reconstitueer het CT-vrije serum met buffer (zie het volume op het etiket). Zorg ervoor dat het onverstoord blijft tot het volledig is opgelost en meng dan goed door voorzichtig om te keren.
- D. Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 199 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (200 x). Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.
- E. Werkend Anti-CT-HRP conjugaat:** Bereid een voldoende hoeveelheid conjugaat oplossing door bijvoorbeeld 40 µl van het geconcentreerde conjugaat (50x) toe te voegen aan 2 ml conjugaat buffer. Verdunning op het ogenblik zelf wordt aanbevolen.

#### VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Ongebruikte putjes moeten bewaard worden bij 2-8°C, in een verzegelde zak met een droogmiddel tot de vervaldatum.
- Na **reconstitutie** moeten kalibrators, controles en CT-vrij serum onmiddellijk worden ingevroren na gebruik omdat ze instabiel zijn en max. gedurende 3 maanden kunnen bewaard worden bij -20°C. Slechts één vries- en ontdooicyclus is toegestaan. Voer kalibrators, controles en CT-vrij serum na het tweede gebruik af.
- De geconcentreerde Wasoplossing is stabiel bij 18-25°C tot de vervaldatum.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is het geconcentreerde conjugaat (50x) houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Het Werkend anti-CT-HRP conjugaat is stabiel gedurende 1 week bij 4°C.
- De chromogene TMB oplossing en de Stopoplossing zijn stabiel bij 2°C tot 8°C tot de vervaldatum.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

#### IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serummonsters moeten bij 2 – 8°C bewaard worden.
- Als monsters niet dezelfde dag gekeurd worden als de bloedafname, is het aan te raden ze te bevriezen tot de bepaling. Monsters kunnen slechts eenmaal ontdooid worden
- Gebruik geen gehemolyseerde monsters.
- Gebruik geen lipemische monsters.

#### X. PROCEDURE

##### A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op 18-25°C komen vóór gebruik. Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Voer kalibrators, controles en monsters in dubbel uit. Een verticale opstelling wordt aanbevolen. Gebruik een proper plastic recipiënt om de Wasoplossing in te bereiden. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbaar pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster. Vermijd voor het toevoegen van de Chromogene Oplossing en de Stopoplossing pipetten met onderdelen van metaal.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

De chromogene oplossing moet kleurloos zijn. Als een donkerblauwe kleur zich ontwikkelt binnen enkele minuten na de bereiding geeft dit aan dat de bereiding onbruikbaar is en moet worden weggegooid.

Breng de Chromogene Oplossing aan binnen de 15 minuten na het wassen van de microtiterplaat.

Tijdens de incubatie met de Chromogene Oplossing moet direct contact met zonlicht vermeden worden.

## B. Procedure

- Selecteer het vereiste aantal putjes voor de test. De ongebruikte putjesmoeten opnieuw verzegeld worden in een zak met droogmiddel en bewaard bij 2-8°C.
- Bevestig de putjes in het rek.
- Pipetteer 100 µl van elke Kalibrator, Controle en Monster in de gepaste putjes.
- Pipetteer 50 µl van het Werkende anti-CT-HRP conjugaat in al de putjes.
- Incubeer gedurende 18 ± 1 uur bij 2-8°C.
- Aspireer de vloeistof van elk putje.
- Was de plaat 3 maal door:
  - 0.4 ml Wasoplossing te verspreiden in elk putje
  - de inhoud van elk putje te aspireren
- Pipetteer 100 µl van de Chromogene TMB oplossing in elk putje binnen de 15 minuten na de wasfase.
- Incubeer de microtiterplaat gedurende 30 minuten bij 18-25°C, vermijd direct zonlicht.
- Pipetteer 100 µl van de Stopoplossing in elk putje.
- Lees de absorbanties bij 450 nm (referentiefilter 630 nm of 650 nm) binnen 1 uur en bereken de resultaten zoals beschreven in sectie XI.

## XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Lees de plaat op 450 nm tegen een referentiefilter gezet op 650 nm (of 630 nm).
- Bereken het gemiddelde van de dubbele bepalingen.
- Zet de OD waarden voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige CT concentratie en teken de kalibratiecurve door de kalibratorpunten.
- Lees de concentratie voor elke controle en monster door interpolatie van de kalibratiecurve.
- Computer geassisteerde datareductie vergemakkelijkt deze berekeningen. Als een automatische verwerking van de resultaten gebruikt wordt, wordt een logistische curveopbouw met 4 parameters aanbevolen.

## XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

CT-U.S.-ELISA		Bichromatisch model (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

## XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

### A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, gedefinieerd als de blijkbaar concentratie twee standaarddeviaties boven de gemiddelde OD bij nul binding, was 0,7 pg/ml.

### B. Specificiteit

Sommige mogelijk interfererende hormonen zijn getest in deze test. Bij concentraties tot 100 ng/ml, toonde geen van de volgende hormonen een significante interferentie:

- CGRP
- Zalm-calcitonine
- PDN 21
- Procalcitonine N terminaal.

## C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	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: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

## D. Nauwkeurigheid

### RECOVERY –TEST

Monster	Toegevoegd CT (pg/ml)	Recovery van CT (pg/ml)	Recovery (%)
Serum	327,7	340,6	104
	160,7	159,3	99
	80,5	80,4	99
	48,3	50,8	105

### VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (pg/ml)	Concentratie die bepaald werd (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

De stalen zijn verdund met CT-vrij human serum.

## E. "Hook"-effect

Een monster, dat met CT gespiket werd tot 480000 pg/ml, levert hogere OD metingen op dan het laatste kalibratiepunt.

## XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Controles die azide bevatten zullen de enzymatische reactie beïnvloeden en mogen niet worden gebruikt.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.
- Het wordt aanbevolen dat de Controles standaard getest worden als onbekende stalen om de variabiliteit van de test te meten. De prestaties van de test moeten gevolgd worden met kwaliteitscontrolefiches van de controles.
- Het wordt aanbevolen de curve geselecteerd door de computer visueel na te kijken.

## XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

### Normale waarden

Stalen van 84 normale individuen hadden waarden onder 11 pg/ml

## XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

### Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een

negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serummonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures. Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd enig contact van de huid met alle reagentia. De Stopoplossing bevat HCl, de chromogene oplossing bevat TMB en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. in geval van contact, grondig wassen met water.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.
- 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

## XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
Kalibrators (0 -5) Monsters, Controles Werkend anti-CT-HRP conjugaat	100 - 50	- 100 50
Incubeer gedurende 18 ± 1 uur bij 2-8°C. Aspireer de inhoud van elk putje. Was 3 maal met 400 µl van de Wasoplossing en aspireer.		
Chromogene oplossing	100	100
Incubeer gedurende 30 minuten bij 18-25°C		
Stopoplossing	100	100
Lees op een microtiterplaatlezer en noteer de absorptantie van elk putje op 450 nm (versus 630 of 650 nm)		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

## CT-U.S.-ELISA

### I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Calcitonin (CT) in Serum.

### II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. Handelsbezeichnung :** DIAsource CT-U.S.-ELISA Kit
- B. Katalognummer :** KAP0421 : 96 Tests
- C. Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91**

**Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75**

**E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)**

### III. 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.




#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource CT-U.S.-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.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Farbcode	Rekonstitution			
 Mikrotiterplatte mit 96 Anti-CT beschichteten brechbaren Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	Blau	<b>gebrauchsfertig</b>			
<table border="1" data-bbox="67 875 295 913"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Konjugat: MRP (Meerrettich-Peroxidase) markierte Anti-CT (monoklonale Antikörper) in stabilisierendem Puffer.	Ab	HRP	CONC	1 Gefäß 0,125 ml	Gelb	50 x mit Konjugatpuffer <b>verdünnen</b>
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="67 1041 231 1079"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Konjugatpuffer: TRIS-Maleate Puffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol	CONJ	BUF	1 Gefäß 6 ml	Rot	<b>gebrauchsfertig</b>	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="67 1167 204 1205"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 0 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in CT-freiem Humanserum	CAL	N	6 Gefäße lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="67 1288 151 1326"><tr><td>SERUM</td></tr></table> CT-freies Humanserum (zur Verdünnung der Proben zu verwenden) mit thymol	SERUM	1 Gefäß lyophilisiert	Schwarz	Puffer <b>zugeben</b> (Rekonstitutionsvolumen siehe Etikett)		
SERUM						
<table border="1" data-bbox="67 1413 151 1451"><tr><td>BUF</td></tr></table> Puffer (serumfrei): Boratpuffer	BUF	1 Gefäß 8 ml	Schwarz	<b>gebrauchsfertig</b>		
BUF						
<table border="1" data-bbox="67 1503 263 1541"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser <b>verdünnen</b> (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="67 1608 231 1646"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mit Gentamycin	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	Silber	0,5 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="67 1727 215 1765"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Farblösung TMB (Tetramethylbenzidin)	CHROM	TMB	1 Gefäß 12 ml	Braun	<b>gebrauchsfertig</b>	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="67 1839 215 1877"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stopplösung: HCL 1N	STOP	SOLN	1 Gefäß 12 ml	Weiß	<b>gebrauchsfertig</b>	
STOP	SOLN					

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

#### VI. 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)

#### VII. 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 Gefäßetikett 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.

#### VIII. 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.

#### IX. 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.

#### X. 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**

- 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.
- Befestigen Sie die Wells im Halterahmen.
- Pipettieren Sie jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- Pipettieren Sie 50 µl des gebrauchsfertigen Anti-CT-MRP Konjugat in alle Wells.
- Inkubieren Sie 18 ± 1 Stunde bei 2 – 8°C.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte 3 mal:
  - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
  - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- Pipettieren Sie 100 µl der Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei 18-25°C; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
- 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 XI beschrieben.

**XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie den c.p.m. für jeden Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration CT (Abszisse) ein und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- 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.

**XII. TYPISCHE WERTE**

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

CT-U.S.-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

**XIII. 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**

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	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. Konz. (pg/ml)	Gemess. Konz. (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 Kalibratorwert.

**XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE**

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen 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.

**XV. REFERENZINTERVALLE**

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

Normalwerte

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

**XVI. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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.

## XVII. LITERATUR

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.
- 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.

## XVIII. 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 18-25°C inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.		



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

## CT-U.S.-ELISA

### *I. USO DEL KIT*

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

### *II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE*

- A. Nome commerciale:** DIAsource CT-U.S.-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP0421: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:  
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

### *III. 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 ipocalcemico 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 monomeric 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.

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIASource CT-U.S.-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.

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti-CT (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="76 891 290 922"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Coniugato: marcato HRP anti-CT (Anticorpi monoclonali) in tampone stabilizzante	Ab	HRP	CONC	1 flacone 0,125 ml	Rosso	Diluire 50 x con buffer coniugato
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1012 236 1043"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Buffer coniugato: tampone TRIS-Maleate con BSA, EDTA e timolo	CONJ	BUF	1 flacone 6 ml	Rosso	Pronte per l'uso	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1133 210 1164"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 0-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano privo di CT	CAL	N	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1299 156 1330"> <tr> <td>SERUM</td> </tr> </table> Siero umano privo di CT (da utilizzare per la diluizione dei campioni) contenente thymol	SERUM	1 flacone lyophil.	nero	Aggiungere buffer (per il volume si veda l'etichetta)		
SERUM						
<table border="1" data-bbox="76 1451 156 1482"> <tr> <td>BUF</td> </tr> </table> Buffer (privo di siero): buffer borato	BUF	1 flacone 8 ml	nero	Pronte per l'uso		
BUF						
<table border="1" data-bbox="76 1550 268 1581"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1671 242 1702"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano contenente gentamicina	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1783 226 1814"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Soluzione cromogena TMB (Tetrametilbenzidina)	CHROM	TMB	1 flacone 12 ml	Bruno	Pronte per l'uso	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="76 1904 274 1935"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Soluzione di arresto: HCl 1N	STOP	SOLN	1 flacone 12 ml	bianco	Pronte per l'uso	
STOP	SOLN					

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

#### VI. 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 µl, 100 µl, 500 µl 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)

#### VII. 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'etichetta della fiala. 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.

#### VIII. 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.

#### IX. 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.

#### X. 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.

#### XI. 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.
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 parametri.

#### XII. 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.

CT-U.S.-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

#### XIII. 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	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione 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.

#### XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, 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.

#### XV. 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.

## XVI. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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.

## XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.

- 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.

## XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Coniugato anti-CT-HRP attivo	100 - 50	- 100 50
Incubare per 18 ± 1 ore a 2-8°C. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogena	100	100
Incubare per 30 minuti a 18-25°C.		
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)		

Lea todo el protocolo antes de usar.

## CT-U.S.-ELISA

### I. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de la calcitonina (CT) humana en suero

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** DIAsource CT-U.S.-ELISA Kit
- B. **Número de catálogo:** KAP0421: 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

**Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:**

**Tel: +32 (0)10 84.99.11**

**Fax: +32 (0)10 84.99.91**

### III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

#### A Actividades biológicas

La calcitonina (CT) es una hormona peptídica de 32 aminoácidos secretada por las células C parafoliculares de la glándula tiroides bajo el control del calcio sérico. Después de la administración aguda, este péptido actúa como una potente hormona hipocalcémica e hipofosfatémica aumentando el aclaramiento renal de calcio y reduciendo la resorción ósea. Sin embargo, su papel fisiológico preciso en el metabolismo óseo aún no se comprende completamente.

Se pueden detectar varias formas de CT en muestras de sangre, incluido un monómero de CT, un monómero oxidado, un dímero, formas de mayor peso molecular y posiblemente un precursor de la CT. Las concentraciones de estos péptidos varían con el estado clínico, la función renal y el origen tisular de la CT (producción normal o ectópica).

El carcinoma medular de tiroides (CMT) es un tumor maligno, desarrollado a partir de las células C, que secreta calcitonina en grandes cantidades. Esta enfermedad se presenta de forma esporádica (80 %) o habitual (20 %), que se transmite como un gen autosómico dominante o como componente de una neoplasia endocrina múltiple (IIb).

También se observa hipercalcitoninemia moderada en el embarazo, anemia perniciosa, insuficiencia renal y durante el período neonatal. Preferiblemente, en este ensayo se detecta la forma monomérica de CT.

#### B Aplicación clínica

La determinación de CT se utiliza para:


- Diagnóstico del carcinoma medular de tiroides (CMT),
- Seguimiento de tumores malignos, para comprobar el éxito de la cirugía y controlar la recidiva,
- Diagnóstico de los casos preclínicos de las formas familiares de CMT (NEM II o síndrome de Sipple) mediante el uso de pruebas de estimulación (calcio o pentagastrina),
- Estudio de la fisiopatología del fosfato de calcio y del metabolismo óseo.



#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DÍASource CT-U.S.-ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich: AcM 1 recubierto – CT humana – AcM 2 – HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB lista para usar) y se incuba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de calcitonina. Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de calcitonina de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Código de color	Reconstitución			
 Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti-CT (anticuerpos)	96 pocillos	azul	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="71 884 295 929"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Conjugado: HRP marcado anti CT (anticuerpos monoclonales) en tampón estabilizador	Ab	HRP	CONC	1 vial 0,125 ml	amarillo	Diluir 50 x con tampón de conjugado
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1008 231 1052"><tr><td>CONJ</td><td>TAM</td></tr></table> Tampón del conjugado: Tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, EDTA y timol	CONJ	TAM	1 vial 6 ml	rojo	Listo para usar	
CONJ	TAM					
<table border="1" data-bbox="71 1131 215 1176"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrador N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en suero humano libre de CT	CAL	N	6 viales liofil.	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1288 151 1332"><tr><td>SUERO</td></tr></table> Suero humano libre de CT (para ser utilizado para la dilución de muestras) con timol	SUERO	1 vial liofil.	negro	Añada tampón (véase el volumen de reconstitución en la etiqueta)		
SUERO						
<table border="1" data-bbox="71 1422 151 1467"><tr><td>TAM</td></tr></table> Tampón (libre de suero): tampón de borato	TAM	1 vial 8 ml	negro	Listo para usar		
TAM						
<table border="1" data-bbox="71 1534 263 1579"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1624 239 1668"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en suero humano con gentamicina	CONTROL	N	2 viales liofil.	plata	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1736 223 1780"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Solución TMB cromogénica (tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	marrón	Listo para usar	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="71 1859 215 1904"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de parada: HCl: 1N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	blanco	Listo para usar	
STOP	SOLN					

**Nota:** 1. Se utilizará suero humano libre de CT para la dilución de muestras.  
2. 1 pg de nuestra preparación de referencia es equivalente a 0,19 µIU del estándar internacional 89/620 del NIBSC.

#### VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensación de: 50 µl, 100 µl, 500 µl y 1 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador tipo vórtex
4. Agitador magnético
5. Lavador de placas de microvaloración
6. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450 nm y a 650 nm (lectura bicromática)

#### VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. Calibradores:** reconstituya los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. Controles:** reconstituya los controles con 0,5 de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200 x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.
- D. Suero libre de CT:** Reconstituya el suero libre de CT con la cantidad de tampón que se indica en la etiqueta del vial. Deje que permanezca en reposo hasta que se disuelva por completo, y después mézclelo bien invirtiéndolo suavemente.
- E. Conjugado anti-CT-HRP de trabajo** Prepare un volumen adecuado de solución de conjugado añadiendo, por ejemplo, 40 µl del conjugado anti-CT-HRP concentrado 50 x a 2 ml de tampón de conjugado. Use un vórtex para homogeneizar. Se recomienda preparar en el momento de usar.

#### VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta del vial, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Los pocillos sin usar deben conservarse a entre 2 y 8 °C en una bolsa sellada que contenga desecante hasta la fecha de caducidad.
- **Tras la reconstitución**, los calibradores, controles y el suero libre de CT son muy inestable y deben congelarse de inmediato después de usar y conservarse a -20 °C durante 3 meses. Solo se permite un ciclo de congelación/descongelación, deseche los calibradores, controles y el suero libre de CT después del segundo uso.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado concentrado (50 x) se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C.
- El conjugado de trabajo anti-CT-HRP es estable durante 1 semana a 4 °C.
- La solución cromogénica de TMB y la solución de parada son estables entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El suero debe conservarse entre 2 y 8 °C.
- Si la prueba no se realiza antes de 24 horas se recomienda conservar en partes alícuotas a -20 °C. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Antes de su uso, todas las muestras de estar a 18-25 °C. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de su uso.
- No utilice muestras hemolizadas.
- No utilice muestras lipémicas.

#### X. PROCEDIMIENTO

- A. Notas sobre la manipulación**  
No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad. No mezcle materiales de distintos lotes de kit. Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente. Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente. Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado. Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra. No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.

Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.

Respete los tiempos de incubación.

Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

La solución cromogénica debe ser incolora. Si unos minutos después de la preparación se vuelve azul oscuro, indica que la preparación no se puede usar y se debe desechar.

Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.

Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

## B. Procedimiento

1. Seleccione el número necesario de pocillos para el análisis. Los pocillos no utilizados deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
2. Fije los pocillos en el marco de soporte.
3. Pipetee 100 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
4. Pipetee 50 µl del conjugado anti-CT-HRP de trabajo en todos los pocillos.
5. Incube durante 18 ± 1 h a 2-8 °C.
6. Aspire el líquido de cada pocillo.
7. Lave la placa 3 veces:
  - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
  - Aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetee 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
9. Incube la placa de microvaloración durante 30 minutos a 18-25 °C evitando la luz solar directa.
10. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
11. Lea las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 1 hora y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

## XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
3. Represente los valores de DO (en las ordenadas) para cada calibrador en función de la concentración correspondiente de calcitonina (abscisas) y trace una curva de calibración por los puntos de los calibradores.
4. Lea la concentración de cada control y muestra mediante interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos con programas informáticos simplificará estos cálculos. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.

## XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

CT-U.S.-ELISA		Modelo bicromático (DO)
Calibrador	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

## XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

### A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por encima del promedio de DO en la unión cero, fue de 0,7 pg/ml.

### B. Especificidad

En este ensayo se han probado algunas hormonas potencialmente interferentes. En concentraciones de hasta 100 ng/ml, ninguna de las siguientes hormonas mostró una interferencia significativa:

- CGRP
- Calcitonina de salmón
- PDN 21
- Procalcitonina N terminal.

## C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	<X> ± SE (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SE (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

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

## D. Exactitud

### PRUEBA DE RECUPERACIÓN

CT añadida (pg/ml)	CT recuperado (pg/ml)	Recuperación (%)
327,7	340,6	104
160,7	159,3	99
80,5	80,4	99
48,3	50,8	105

### PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. teórica (pg/ml)	Concent. medida (pg/ml)
Suero 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

Las muestras se diluyeron con el suero libre de CT.

## E. Efecto gancho

Una muestra a la que se añadieron 480000 pg/ml de CT arroja una DO más alta que el punto del último calibrador.

## XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

## XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

### Valores normales

En 84 muestras de sujetos normales se obtuvieron valores inferiores a 11 pg/ml.

## XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA,

siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene HCl, la solución cromogénica contiene TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En caso de contacto, lávese bien con agua.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

## XVII. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.
- 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.

## XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROLES (µl)
Calibradores (0-5) Controles, muestras Conjugado anti-CT-HRP de trabajo	100 - 50	- 100 50
Incube durante 18 ± 1 horas a 2 – 8 °C. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 µl de solución de lavado y aspire.		
Solución de TMB cromogénica	100	100
Incube durante 30 min a 18-25 °C.		
Solución de parada	100	100
Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (frente a 630 o 650 nm).		

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

## CT-U.S.-ELISA

### I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Ensaio imunoenzimático para determinação quantitativa *in vitro* da Calcitonina humana (CT) no soro.

### II. INFORMAÇÃO GERAL

- A. **Nome do proprietário**    DIAsource CT-U.S.-ELISA Kit
- B. **Nº de catálogo :**            KAP0421 : 96 testes
- C. **Produzido por :**            DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Para assistência técnica ou encomendas, contacte:**  
**Tel : +32 (0)10 84 99 11 - Fax : +32 (0)10 84 99 91**

### III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA

#### A. Actividades biológicas

A calcitonina (CT) é um polipeptídeo de 32 aminoácidos segregado pelas células parafoliculares (células C) da tiróide, sob o controlo dos níveis séricos de cálcio. Após uma administração aguda, este peptídeo actua como uma potente hormona hipocalcémica e hipofosfatémica, aumentando a excreção de cálcio renal e reduzindo a reabsorção óssea. No entanto, o seu papel fisiológico preciso no metabolismo ósseo ainda não é completamente conhecido.

Podem ser detectadas várias formas de CT em amostras de sangue, incluindo um monómero de CT, um monómero oxidante, um dímero, formas de elevado peso molecular e, possivelmente, precursoras da CT. As concentrações destes peptídeos variam consoante o estado clínico, a função renal e a origem tecidual da CT (produção normal ou ectópica).

O carcinoma modular da tiróide (MTC) é um tumor maligno, desenvolvido a partir das células C, segregando calcitonina em grande excesso. Esta doença ocorre, quer de forma esporádica (80%), quer familiar (20%), sendo transmitida como um gene autosómico dominante ou como um componente de neoplasia endócrina múltipla (IIB).

É, também, observada hipercalcitoninemia moderada na gravidez, anemia perniciososa, insuficiência renal e durante o período neonatal. Preferencialmente, a forma monomérica da CT é detectada neste ensaio.

#### B. Aplicação clínica


A determinação da CT pelo presente ELISA é utilizada:

- no diagnóstico do carcinoma medular da tiróide (MTC)
- no acompanhamento de tumores malignos, para verificar o êxito da cirurgia e para controlar a recorrência
- no diagnóstico de casos pré-clínicos de familiares de MTC (MEN II ou síndrome de Sipple) através da utilização de testes de estimulação (cálcio ou pentagastrina)
- no estudo da patofisiologia do metabolismo do cálcio-fosfato e do metabolismo ósseo.

#### IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O DIAsource CT-U.S.-ELISA é um Imunoensaio de Sensibilidade Amplificada a Enzimas de fase sólida, realizado em placas de micro titulação. Os calibradores e amostras reagem com o anticorpo monoclonal de captura (AMB 1) revestido em poço de micro titulação e com um anticorpo monoclonal (AMB 2) rotulado com peroxidase de armadorio (PA). Após um período incubatório que permite a formação de uma sanduíche: AMB 1 revestido – CT humano – AMb 2 – PA, a placa de micro titulação é lavada para remover a parte livre do anticorpo rotulado enzimaticamente. O anticorpo ligado rotulado enzimaticamente é avaliado através de uma reacção cromogénica. A solução cromogénica (TMB pronta a utilizar) é adicionada e incubada. A reacção é interrompida com a adição de uma Solução de Paragem e, depois, a placa de micro titulação é lida no comprimento de onda apropriado. A quantidade de substrato turnover é determinada colorimetricamente, medindo a sua absorção, proporcional à concentração de CT. A curva de calibração é traçada e a concentração de CT nas amostras é determinada por interpolação através da curva de calibração.

#### V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 testes	Código de cor	Reconstituição			
 Placa de micro titulação com 96 poços removíveis recobertos com anti- CT (Acs monoclonais)	96 poços	azul	Pronto a utilizar			
<table border="1" data-bbox="71 862 300 913"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugação: Anti-CT rotulada com PA (Acs monoclonais) num tampão estabilizante	Ab	HRP	CONC	1 recipiente 0,125 ml	amarelo	Dilua 50 x com tampão conjugado
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1025 236 1070"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugue o tampão: em tampão TRIS-Maleate com soro bovino albumina, EDTA e tímolo	CONJ	BUF	1 recipiente 6 ml	vermelho	Pronto a utilizar	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1182 215 1227"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrador - N = 0 a 5 (ver valores exactos nos rótulos dos recipientes) em soro humano sem CT	CAL	N	6 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1339 156 1384"> <tr> <td>SERUM</td> </tr> </table> Soro humano sem CT (a utilizar na diluição de amostras) com tímolo	SERUM	1 recipiente liofil.	preto	Adicione tampão (ver o volume no rótulo)		
SERUM						
<table border="1" data-bbox="71 1473 156 1518"> <tr> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampão (sem soro): tampão borato	BUF	1 recipiente 8 ml	preto	Pronto a utilizar		
BUF						
<table border="1" data-bbox="71 1574 268 1619"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solução de lavagem (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 200 x com água destilada (use um agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1664 242 1709"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlos - N = 1 ou 2 Em soro humano com gentamicina	CONTROL	N	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1776 226 1821"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Solução Cromogénica TMB (Tetrametilbenzidina)	CHROM	TMB	1 recipiente 12 ml	castanho	Pronto a utilizar	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="71 1899 215 1944"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solução de Paragem: HCl 1N	STOP	SOLN	1 recipiente 12 ml	branco	Pronto a utilizar	
STOP	SOLN					

**Note:** 1. Use soro humano sem CT para a diluição das amostras.  
2. 1 pg da preparação padrão é equivalente a 0.19 µIU NIBSC 89/620.

#### VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

1. Água destilada de elevada qualidade
2. Pipetas automáticas de: 50 µl, 100 µl, 500 µl e 1 ml (recomenda-se o uso de pipetas adequadas com pontas descartáveis)
3. Misturador vortex
4. Agitador magnético
5. Lavador de placas de micro titulação
6. Leitor de placas de micro titulação com capacidade de realizar leituras a 450 nm e 650 nm (em leituras bicromáticas)

#### VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. Calibradores:** Reconstitua os calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- B. Controlos:** Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- C. Solução de Lavagem de Trabalho:** Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho, adicionando 199 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (200x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução de lavagem não utilizada no final do dia.
- D. Soro sem CT:** Reconstitua o Soro sem CT com a quantidade de tampão que estiver indicada na etiqueta do pequeno frasco. Deixe que permaneça imperturbado até que se dissolva por completo. De seguida, misture bem com inversão cuidadosa.
- E. Conjugado anti-CT-HP funcional:** Prepare um volume adequado de solução conjugada adicionando por exemplo: 40µl de conjugado anti-CT-HRP concentrado 50X para 2 ml de tampão conjugado. A diluição extemporânea está recomendada.

#### VIII. CONSERVAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos, todos os componentes do kit ficam estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2-8°C.
- Poços não utilizadas devem ser guardadas a temperaturas entre 2-8°C, num saco selado contendo um dessecante, até à sua data de validade ser ultrapassada.
- Após reconstituição,** os calibradores e controlos são muito instáveis, pelo que deverão ser usados imediatamente após a reconstituição. Para períodos de conservação mais longa, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por um período máximo de 6 semanas. A congelação deverá ser imediatamente realizada após a utilização. Não espere para congelar até todas as amostras estarem pipetadas.
- A Solução de Lavagem concentrada é estável à 18-25°C até que a sua data de validade seja ultrapassada.
- A Solução de Lavagem de Trabalho recentemente preparada deve ser utilizada no mesmo dia.
- Após a 1ª utilização, o conjugado concentrado (50x) é estável até ao final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original bem fechado, entre 2 a 8°C
- O conjugado de Trabalho anti-CT-HP é estável durante 1 semana a 4°C.
- A solução cromogénica TMB e a Solução de Paragem são estáveis a temperaturas entre os 2°C e os 8°C, até que a sua data de validade seja ultrapassada.
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

#### IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- O soro deve ser mantido a temperaturas entre 2 - 8°C.
- Se o teste não for efectuado num prazo de 24 horas, é recomendado o armazenamento dos componentes em alíquotas a uma temperatura de -20°C. Evite realizar ciclos de congelação/descongelação subsequentes..
- Não utilize amostras hemolisadas.
- Não utilize amostras lipémicas.

#### X. PROCEDIMENTO

##### A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou os seus componentes após a expiração do prazo de validade.  
Não misture componentes de lotes diferentes.  
Misture completamente os reagentes e as amostras com agitação ou rotação suaves.  
Realize calibradores, controlos e amostras em duplicado. É recomendado um alinhamento vertical.  
Utilize um contentor limpo de plástico para preparar a Solução de Lavagem.

Para evitar contaminações cruzadas, use uma pipeta com ponta descartável para a adição de cada reagente e amostra.

Quando dispensar a Solução Cromogénica e a Solução de Paragem, evite utilizar pipetas com partes em metal.

As pipetas de precisão elevada ou a pipetagem automática vão aumentar a precisão.

Respeite os tempos de incubação.

Prepare uma curva padrão para cada análise e não utilize dados de análises anteriores.

Dispense a Solução Cromogénica quando tiverem decorrido 15 minutos após a lavagem das placas de micro titulação.

Durante a incubação com a Solução Cromogénica, evite o contacto directo da luz do sol com a placa de micro titulação.

## B. Procedimento

1. Retire o número de poços que irá necessitar para a utilização que vai realizar. Os poços que não forem utilizadas deverão ser colocadas no saco com um dessecante e armazenadas a uma temperatura entre 2-8°C.
2. Guarde os poços no interior do seu invólucro.
3. Verta com a pipeta 100 µl de cada Calibrador, Controlo e Amostra no interior dos poços apropriados para cada um deles.
4. Verta com a pipeta 50 µl de conjugado anti-CT-PA funcional em todos os poços.
5. Incube durante 18 ± 1 horas a uma temperatura entre 2-8°C.
6. Aspire o líquido de cada um dos poços.
7. Lave a placa 3 vezes do seguinte modo:
  - dispense 0.4 ml de Solução de Lavagem no interior de cada poço
  - aspire o conteúdo de cada poço
8. Verta com a pipeta 100 µl de solução Cromogénica em cada um dos poços quando tiverem decorrido 15 minutos após os procedimentos de lavagem.
9. Incube as placas de micro titulação durante 30 minutos à 18-25°C. Evite a exposição à luz solar directa.
10. Verta com a pipeta 100 µl de Solução de Paragem em cada poço.
11. Leia as absorções a 450 nm (filtro de referência 630 nm ou 650 nm) durante 1 hora e calcule os resultados tal com está descrito na secção XI.

## XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Leia a placa a 450 nm contra um filtro de referência regulado a 650 nm (ou 630 nm).
2. Calcule a forma de duplicar determinações.
3. Assinale os valores de OD (ordenada) para cada calibrador e as correspondentes concentrações de CT (abscissa) e desenhe uma curva de calibração.
4. Leia a concentração de cada controlador e amostra por interpolação da curva de calibração.
5. A redução de dados assistida por computador simplificará estes cálculos. Se for utilizado o processamento automático dos resultados, é recomendada a utilização de um formato em curva para uma função logística de 4 parâmetros.

## XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas como exemplo e nunca devem ser utilizados em vez da curva de calibração executada em tempo real.

CT-U.S.-ELISA		Modelo bicromático (OD)
Calibradore	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

## XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

### A. Limite da detecção

Os calibradores de vinte zeros foram testados em simultâneo com um conjunto de outros calibradores. O limite de detecção, definido como a concentração aparente, dois desvios padrão acima do OD médio a compulção zero, foi de 0,7 pg/ml.

### B. Especificidade

Algumas hormonas potencialmente interferentes foram testadas neste ensaio. Em concentrações até 100 ng/ml, nenhuma das seguintes hormonas demonstrou uma interferência significativa:

- CGRP
- Calcitonina de salmão
- PDN 21
- Procalcitonina N terminal.

## C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (pg/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (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

DP : Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

## D. Exactidão

### TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	CT Adicionado (pg/ml)	CT Recuperado (pg/ml)	Recuperação (%)
Soro	327,7	340,6	104
	160,7	159,3	99
	80,5	80,4	99
	48,3	50,8	105

### TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico. (pg/ml)	Conc. medida (pg/ml)
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

As amostras foram diluídas com Soro humano sem CT.

## E. Efeito "Hook"

Uma amostra com CTT até 480000 pg/ml fornece OD's mais elevadas do que o último ponto de calibração.

## XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controlo 1 e/ou 2 não se situarem dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser usados, sem que haja uma explicação satisfatória para a discrepância verificada.
- Se necessário, cada laboratório pode fazer os seus pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas na forma de alíquotas congeladas. Os controladores, como contêm azida, interferem directamente com as reacções enzimáticas e, por isso, não podem ser utilizados.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas Laboratoriais.
- É recomendado que os Controladores sejam rotineiramente testados como se de amostras desconhecidas se tratasse, para avaliar a variabilidade do teste. O desempenho do teste deverá ser monitorizado com gráficos de controlo de qualidade dos controladores.
- É boa prática a verificação visual do formato da curva seleccionado pelo computador.

## XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas a título de referência. Cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio intervalo normal de valores.

### Valores Padrão

84 amostras de sujeitos normais obtiveram valores inferiores a 11 pg/ml.

## XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

### Segurança

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

O material de origem humana utilizado na preparação do reagente foi testado e considerado não reactivo ao antigénio de superfície da Hepatite B (HBs Ag), aos anticorpos do vírus da Hepatite C (HCV) e aos anticorpos do vírus da Imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2). Dado que nenhum método de ensaio conhecido pode oferecer a segurança completa da ausência de agentes infecciosos, manusear os reagentes e as amostras dos doentes como potencialmente infecciosos.

Todos os produtos animais e derivados foram recolhidos a partir de animais saudáveis. Os componentes bovinos são oriundos de países onde não foram notificados casos de BSE. No entanto, os componentes com substâncias animais devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto de qualquer superfície da pele com quaisquer reagentes. A Solução de Paragem contém HCl, o cromogénio contém TMB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ocorrer qualquer tipo de contacto, lave abundantemente a superfície exposta com água. Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete pela boca. Use vestuário de protecção e luvas descartáveis.

## XVII. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.
- 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

## XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	AMOSTRA(S) CONTROLOS (µl)
Calibradores (0-5) Amostras, Controlos Conjugado Anti-CT-PA funcionante	100 - 50	- 100 50
Incubar durante 18 ± 1 horas a temperaturas entre 2-8°C. Aspirar o conteúdo de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 µl de Solução de Lavagem e aspirar.		
Solução Cromogénica	100	100
Incubar durante 30 min à 18-25°C.		
Solução de Paragem	100	100
Ler no leitor de placas de micro titulação e registar a absorvência de cada poço a 450 nm (contra 630 ou 650 nm)		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

## CT-U.S.-ELISA

### I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης καλσιτονίνης (CT) στον ορό.

### II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ CT-U.S.-ELISA της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP0421: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:  
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

### III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

#### A Βιολογική δράση

Η καλσιτονίνη (CT) είναι μια πεπτιδική ορμόνη 32 αμινοξέων που εκκρίνεται από τα παραθυλακικά C-κύτταρα του θυρεοειδούς αδένου υπό έλεγχο του ασβεστίου του ορού. Μετά από άμεση χορήγηση, αυτό το πεπτίδιο δρα ως πιθανή υπασβεστιαστική και υποφωσφαταιμική ορμόνη αυξάνοντας την αποβολή του ασβεστίου μέσω των νεφρών και μειώνοντας την απορρόφηση των οστών. Ωστόσο, ο ακριβής φυσιολογικός της ρόλος στο μεταβολισμό των οστών δεν έχει κατανοηθεί ακόμη πλήρως.

Διάφορες μορφές CT μπορούν να ανιχνευθούν σε δείγματα αίματος, συμπεριλαμβανομένου ενός μονομερούς της CT, ενός οξειδωμένου μονομερούς, ενός διμερούς, μορφών με υψηλότερο μοριακό βάρος και πιθανότατα ενός προδρόμου της CT. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων αυτών ποικίλλουν ανάλογα με την κλινική κατάσταση, τη νεφρική λειτουργία και την ιστική προέλευση της CT (φυσιολογική ή εκτοπική παραγωγή).

Το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς (MTC) είναι ένας κακοήθης όγκος, που αναπτύσσεται από τα C-κύτταρα, ο οποίος απεκκρίνει υπερβολικές ποσότητες καλσιτονίνης. Η νόσος αυτή εμφανίζεται είτε σε σποραδική (80%) είτε σε οικογενή (20%) μορφή, η οποία μεταβιβάζεται ως αυτοσωματικό κυρίαρχο γονίδιο είτε ως στοιχείο πολλαπλής ενδοκρινούς νεοπλασίας (IIb).

Μέτρια υπερκαλσιτονιναϊμία παρατηρείται επίσης κατά την εγκυμοσύνη, την κακοήθη αναιμία, τη νεφρική ανεπάρκεια και κατά τη διάρκεια της περιόδου των πρώτων εβδομάδων της ζωής. Κατά προτίμηση, στον προσδιορισμό αυτό ανιχνεύεται η μονομερής μορφή της CT.

#### B Κλινική εφαρμογή

Η μέτρηση της CT χρησιμοποιείται για:


- Διάγνωση του μυελοειδούς καρκινώματος του θυρεοειδούς (MTC)
- Παρακολούθηση κακοήθων όγκων, για έλεγχο της επιτυχίας χειρουργικής επέμβασης και παρακολούθηση της περίπτωσης υποτροπής
- Διάγνωση προκλινικών περιπτώσεων οικογενών μορφών του MTC (MEN II ή σύνδρομο Sipple) με τη χρήση εξετάσεων διεγερσης (ασβέστιο ή πενταγαστρίνη) Μελέτη της παθοφυσιολογίας του φωσφορικού ασβεστίου και του μεταβολισμού των οστών.



#### IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός CT-U.S.-ELISA της DIASource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAb 1 – ανθρώπινη CT – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της καλιτονίνης. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της CT στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση			
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 αποσπώμενες υποδοχές επιστρωμένες με αντι CT (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1" data-bbox="71 922 295 967"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Σύζευγμα: Αντι-CT (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε σταθερόπυκτικό διάλυμα	Ab	HRP	CONC	1 φιαλίδιο 0,125 ml	κίτρινο	Αραιώστε 50 x με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1102 215 1146"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκωματίνη, EDTA και θυμόλη	CONJ	BUF	1 φιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1303 199 1348"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Βαθμονομητής N = 0 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό χωρίς CT	CAL	N	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1482 151 1527"> <tr> <td>SERUM</td> </tr> </table> Ανθρώπινος ορός χωρίς CT (που θα χρησιμοποιηθεί για αραιώση δειγμάτων) με θυμόλη	SERUM	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	μαύρο	Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα (δείτε τον όγκο ανασύστασης στην ετικέτα)		
SERUM						
<table border="1" data-bbox="71 1639 151 1684"> <tr> <td>BUF</td> </tr> </table> Ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς ορό): ρυθμιστικό διάλυμα βορικών	BUF	1 φιαλίδιο 8 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση		
BUF						
<table border="1" data-bbox="71 1774 295 1818"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1908 231 1953"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με γενταμικίνη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N					

CHROM	TMB	1 φιαλίδιο 12 ml	καφέ	Έτοιμο για χρήση
Διάλυμα χρωμογόνου TMB (Τετραμεθυλβενζιδίνη)				
STOP	SOLN	1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1N				

Σημείωση: 1. Ανθρώπινος ορός χωρίς CT πρέπει να χρησιμοποιηθεί για αραιώση δειγμάτων.

2. 1 pg του δικού μας παρασκευάσματος αναφοράς είναι ισοδύναμο με 0,19 mIU NIBSC 89/620.

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 500 μl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με ανάλωσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
6. Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (δichρωματική ανάγνωση)

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- A. Βαθμονομητές: Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.
- Δ. Ορός χωρίς CT: Ανασυστήστε τον ορό χωρίς CT με την ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που αναφέρεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Αφήστε τον ακίνητο μέχρι να επέλθει πλήρης διάλυση, κατόπιν αναμειξτε καλά με απαλή αναστροφή.
- E. Σύζευγμα εργασίας αντι-CT-HRP: Προετοιμάστε επαρκή όγκο συζευκτικού διαλύματος προσθέτοντας π.χ.: 40 μl του 50 x συμπυκνωμένου αντι CT-HRP συζεύγματος σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος συζεύγματος. Συνιστάται αυτοσχέδια αραιώση.

#### VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Αχρησιμοποίητες υποδοχές πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- **Μετά την ανασύσταση**, βαθμονομητές, υλικά ελέγχου και ορός χωρίς CT θα πρέπει να καταψύχονται αμέσως μετά τη χρήση και να διατηρούνται στους -20° C επί 3 μήνες. Επιτρέπεται μόνον ένας κύκλος κατάψυξης-απόψυξης. Μετά τη δεύτερη χρήση, απορρίψτε τους βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τον ορό χωρίς CT.
- Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε 18-25° C μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, το συμπυκνωμένο σύζευγμα (50x) παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Το σύζευγμα εργασίας αντι-CT-HRP παραμένει σταθερό επί μία εβδομάδα στους 4° C.
- Το διάλυμα χρωμογόνου TMB και το ανασχετικό διάλυμα παραμένουν σταθερά σε θερμοκρασία 2° C έως 8° C μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

## IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός θα πρέπει να διατηρείται στους 2 - 8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση.
- Μη χρησιμοποιείτε λιπαρικά δείγματα.

## X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό ανάλωσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστήριου και δείγματος προκειμένου να αποφυγετε την επιμόλυνση. Για τη διανομή του αποκαλυπτικού διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις. Διανείμετε το αποκαλυπτικό διάλυμα εντός 15 λεπτών μετά την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Κατά τη διάρκεια της επώασης με το αποκαλυπτικό διάλυμα, αποφύγετε την άμεση έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στην ηλιακή ακτινοβολία.

### B. Διαδικασία

- Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό υποδοχών για την ανάλυση. Οι αχρησιμοποίητες υποδοχές πρέπει να ξανασφραγίζονται στη σακούλα που περιέχει τον αποξηραμένο παράγοντα και να φυλάσσονται στους 2-8°C.
- Ασφαλίστε τις υποδοχές μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl συζεύγματος εργασίας αντι-CT-HRP μέσα σε όλες τις υποδοχές.
- Επώαστε για 18 ± 1 ώρα στους 2-8° C.
- Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
  - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
  - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl χρωμογόνου διαλύματος μέσα σε κάθε υποδοχή 15 λεπτά μετά το βήμα της πλύσης.
- Επώαστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης για 30 λεπτά σε 18-25°C αποφεύγοντας την άμεση επαφή με την ηλιακή ακτινοβολία.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού αντιδραστήριου σε κάθε υποδοχή.
- Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

## XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της CT (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

## XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

CT-U.S.-ELISA		Διχρωματικό μοντέλο (OD)
Βαθμονομητής	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

## XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

### A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,7 pg/ml.

### B. Ειδικότητα

Στον προσδιορισμό αυτό εξετάστηκαν μερικές ορμόνες που δυνητικώς επιδρούν. Σε συγκεντρώσεις έως 100 ng/ml, καμία από τις ακόλουθες ορμόνες δεν έδειξε σημαντική επίδραση:

- CGRP
- Καλσιτονίνη σολομού
- PDN 21
- Προκαλσιτονίνη N-τελικού άκρου.

### Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
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

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

### Δ. Ορθότητα

#### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα CT (pg/ml)	Ανακτηθείσα CT (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	327,7	340,6	104
	160,7	159,3	99
	80,5	80,4	99
	48,3	50,8	105

#### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
Ορός	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

Τα δείγματα αραιώθηκαν με ορό χωρίς CT.

### Ε. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με CT έως 480000 pg/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

#### XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (rools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

#### XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

##### Φυσιολογικές τιμές

84 δείγματα από φυσιολογικά άτομα έδωσαν τιμές κάτω από 11 pg/ml.

#### XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

##### Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός των αντιδραστηρίων, των δειγμάτων ορού πρέπει γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά. Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl, το χρωμογόνο διάλυμα περιέχει TMB και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

#### XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- BODY J.J. et al. (1987)  
**SCC antigen and other tumor markers in lung cancer: preliminary results.**  
Excerpta Medica, 162-170.
- 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.
- 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.
- 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.

#### XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ- ΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, οροί ελέγχου Σύζευγμα εργασίας αντι- CT-HRP	100 - 50	- 100 50
Επωάστε για 18 ± 1 ώρα στους 2-8° C. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Διάλυμα χρωμογόνου TMB	100	100
Επωάστε για 30 λεπτά σε 18-25°C		
Ανασχετικό διάλυμα	100	100
Κάντε ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (έναντι 630 ή 650 nm)		