

Instructions for Use

Calcitonin ELISA

IVD



REF EIA-3648

 96



DRG 

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

Distributed by:

DRG 

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

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

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

1	NAME AND INTENDED USE.....	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION	3
3	CLINICAL RELEVANCE	3
4	PRINCIPLE OF THE TEST	3
5	KIT COMPONENTS.....	4
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS	4
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	4
8	REAGENT PREPARATION AND STORAGE	5
9	ASSAY PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11	QUALITY CONTROL	7
12	LIMITATION OF THE PROCEDURE	7
13	EXPECTED VALUES.....	7
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	10
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG	10
3	KLINISCHE BEDEUTUNG	10
4	TESTPRINZIP	10
5	TESTKIT-KOMPONENTEN	11
6	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	11
7	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG	12
8	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG	12
9	TESTVERFAHREN	13
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
11	QUALITÄTSKONTROLLE.....	15
12	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	15
13	ERWARTETE WERTE	15
14	LEISTUNGSMERKMALE.....	16
1	USO PREVISTO	18
2	RIEPILOGO E SPIEGAZIONE	18
3	SIGNIFICATO CLINICO.....	18
4	PRINCIPIO DEL TEST	18
5	COMPONENTI DEL KIT	19
6	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	19
7	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	19
8	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE	20
9	PROCEDURA DI ANALISI	20
10	CALCULO DEI RISULTATI	21
11	CONTROLLO QUALITÀ.....	22
12	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA	22
13	VALORI PREVISTI.....	22
14	CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA.....	23

1	USO PREVISTO	25
2	RESUMEN Y EXPLICACIÓN	25
3	TRASCENDENCIA CLÍNICA	25
4	PRINCIPIO DE LA PRUEBA	25
5	COMPONENTES DEL KIT	26
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS	26
7	RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	27
8	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS.....	27
9	PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS	28
10	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	29
11	CONTROL DE CALIDAD	30
12	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	30
13	VALORES PREVISTOS.....	31
14	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	31
15	REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA	34
	SYMBOLS USED.....	35

1 NAME AND INTENDED USE

The Calcitonin ELISA is intended for the quantitative determination of Calcitonin in human serum.

The test is for in vitro diagnostic use only.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

Calcitonin, a 32-amino-acid polypeptide, is secreted primarily by the thyroidal parafollicular C-cells. Its main biological effect is to inhibit osteoclastic bone resorption. This property has led to Calcitonin's use for disorders characterized by increased resorption such as Paget's disease, for some patients with osteoporosis.

3 CLINICAL RELEVANCE

The most prominent clinical syndrome associated with a disordered hypersecretion of Calcitonin is medullary carcinoma of the thyroid (MTC). MTC is a tumor of the Calcitonin producing C-cells of the thyroid gland. Although MTC is rare, comprising 5 - 10% of all thyroid cancer, it is often fatal. It may occur sporadically or in a familial form that is transmitted as an autosomal dominant trait. MTC has great clinical importance because of its familial distribution. Further, it leans itself to be diagnosed early by serum Calcitonin and total cure for early sub-clinical disease is possible[1]. This is frequently associated with other clinical features and it has good potential for cure with surgery. Although a rare tumor, it can occur in a familial pattern[1,3,4] as a Type II multiple endocrine neoplasia. These tumors usually produce diagnostically elevated serum concentrations of Calcitonin. Therefore, the immunoassay for Calcitonin in serum can be used to diagnose the presence of MTC with an exceptional degree of accuracy and specificity. In the small but increasing percentage of patients, however, basal hormone levels are indistinguishable from normal[1]. Some of these subjects represent the early stages of C-cell neoplasia or hyperplasia that are most amenable to surgical cure. To identify these patients with early disease, provocative tests for Calcitonin secretion is necessary to preclude false negatives if only basal Calcitonin determination are performed. Most tumors respond with increased Calcitonin level to the administration of either calcium[5] or pentagastrin[6] or their combination[7], but either agent can still give misleading results. Therefore, in cases with clinical manifestations, both agents should be considered for diagnostic testing. Further, Calcitonin measurements can also be used to monitor the efficacy of therapy in patients with Calcitonin producing tumors.

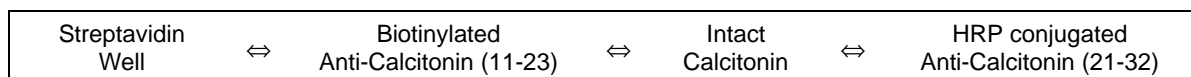
It has been reported[8] that multiple forms of immunoreactive calcitonin are found in either normal subjects or patients with MTC. These various forms of calcitonin have molecular weights varying from 3,400 (monomeric) up to 70,000 Dalton (polymeric).

Neoplastic disorders of other neuroendocrine cells can also elevate Calcitonin. The best example is small cell lung cancer. Other tumors such as carcinoids and islet cell tumors of the pancreas can also result in elevated serum Calcitonin.

Increases in serum Calcitonin has also been noted in both acute and chronic renal failure, hypercalciuria and hypercalcemia.

4 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Calcitonin Immunoassay is a two-site ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] for the measurement of the biologically intact 32 amino acid chain of Calcitonin. It utilizes two different mouse monoclonal antibodies to human calcitonin specific for well-defined regions on the calcitonin molecule. One antibody binds only to Calcitonin 11-23 and this antibody is biotinylated. The other antibody binds only to Calcitonin 21-32 and this antibody is labeled with horseradish peroxidase [HRP] for detection.



In this assay, calibrators, controls, or patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled antibody and a biotin coupled antibody in a streptavidin-coated microplate well. Thus the calcitonin in the sample is "sandwiched" between these two antibodies. At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of calcitonin in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of calcitonin present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

5 KIT COMPONENTS

Kit Components	Description	Quantity
RGT 1 = Reagent 1	Biotinylated Calcitonin Antibody	1 x 7.0 mL
RGT 2 = Reagent 2	Peroxidase (Enzyme) labeled Calcitonin Antibody	1 x 7.0 mL
RGT 3 = Reagent 3	Reconstitution Solution containing EDTA	1 x 10 mL
RGT A = Reagent A	ELISA Wash Concentrate [Saline with surfactant]	1 x 30 mL
RGT B = Reagent B	TMB Substrate [tetramethylbenzidine]	1 x 20 mL
SOLN = Stopping Solution	ELISA Stop Solution [1 N sulfuric acid]	1 x 20 mL
PLA = Microplate	One holder with Streptavidin Coated Strips.	12 x 8-well strips
CAL = Calibrators A: 0 pg/mL B – F: Refer to vial labels for exact concentrations	Lyophilized synthetic h-Calcitonin. Lyophilized Zero calibrator [BSA solution]. All other calibrators consist of synthetic h-Calcitonin (1-32) in BSA solution, calibrated to <i>WHO 2nd IS 89/620</i>	1 x 2 mL for the zero calibrator 1 x 1 mL for all other calibrators
CTRL = Controls 1 & 2 Refer to vial labels for exact ranges	Lyophilized. 2 Levels. Synthetic h-Calcitonin (1-32) in BSA solution.	1 x 1 mL per level

5.1 Material and Equipment required but not provided

- Microplate reader capable of measuring absorbance at wavelengths of 450 nm and 405 nm.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing may be acceptable].
- Precision pipettors to deliver 50, 100 and 150 µL.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 50, 100 and 150 µL.
- Microplate Shakers: DRG has found for shaker diameters indicated below, the Streptavidin kits will maintain optimal performance response at the following speed settings:

Microplate Shakers	Shaking diameter	Speed setting
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 rpm
Linear	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 rpm

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

Although the reagents provided in this kit have been specifically designed to contain no human blood components, the human patient samples, which might be positive for HBsAg, HBcAg or HIV antibodies, must be treated as potentially infectious biohazard. Common precautions in handling should be exercised, as applied to any untested patient sample.

Stopping Solution consists of 1 N Sulfuric Acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection, with appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breath vapor and avoid inhalation.

If turbidity is observed in any reagent, do not perform assay and please contact your supplier.

Various types of shakers with different specifications are commercially available. In the event that the microplate shaker does not fall within the specified range above, each laboratory is encouraged to set their own optimal range.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The determination of Calcitonin should be performed with serum.

To assay the specimen in duplicate, 200 µL of serum is required. Collect whole blood without anticoagulant. After allowing blood to clot, the serum should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at -20 °C or lower.

Avoid grossly hemolyzed, lipemic, and icterus samples.

8 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all kit components at 2 °C - 8 °C.

1. All reagents except the calibrators, kit controls and the Wash Concentrate are ready-to-use. Store all reagents at 2 °C - 8 °C.
2. Reconstitute Calibrator A (Zero standard) with 2.0 mL distilled or deionized water and mix. For each of the non-zero calibrators (Calibrator B through F) and kit controls 1 and 2, reconstitute each vial with 1.0 mL of Reagent 3 (Reconstitution Solution) and mix. Allow the vials to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Use the calibrators and controls as soon as possible upon reconstitution. Freeze (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use in a non-self-defrosting freezer.** Standards and controls are stable at -20 °C for 6 weeks after reconstitution with up to 3 freeze thaw cycles when handled as recommended in "Procedural Notes" section.
3. **ELISA Reagent A:** Wash Concentrate: Mix contents of wash concentrate thoroughly. If precipitate is present in the Wash Concentrate due to storage at lower temperature such as 4 °C, dissolve by placing the vial in a 37 °C water bath or oven with swirling or stirring. Add wash concentrate (30 mL) to 570 mL of distilled or deionized water and mix. The diluted working wash solution is stable for 90 days when stored at room temperature.

9 ASSAY PROCEDURE

1. Place sufficient Streptavidin Coated Strips in a holder to run all the six (6) calibrators, A - F of the Calcitonin CALIBRATORS [Exact concentration is stated on the vial label], Quality Control Sera and patient samples. At a minimum, designate two wells to serve as "blanks". Refer to Step 10 for final plate reading.
2. Pipet 100 µL of calibrators, controls, and samples into the designated or mapped well. **Freeze (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use, in a non-self-defrosting freezer.**
3. Add or dispense 50 µL of Reagent 1 (Biotinylated Antibody) into each of the wells which contain the calibrators, controls, and samples.
4. Add or dispense 50 µL of Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) into each of the same wells.
5. Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on an **shaker** set at recommended settings (see section 5.1) for **4 hours ± 30 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
6. First aspirate the fluid completely and then wash/aspirate each well five (5) times with the Working Wash Solution (prepared from Reagent A), using an automatic microplate washer. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
7. Add or dispense 150 µL of the ELISA Reagent B (TMB Substrate) into each of the wells, except the blank wells.
8. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on an **shaker** set at recommended settings (see section 5.1) for **30 ± 5 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
9. Add or dispense 100 µL of the Stopping Solution into each of the wells, except the blank wells. Mix gently.
10. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions by using the blank wells.* Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**. **Read the plate again** with the reader set to **405 nm** also against distilled or deionized water.

* If due to technical reasons the ELISA plate reader cannot be adjusted to zero using "blank," subtract the "blank," absorbance value from all other absorbance values to obtain results.

Note: The second reading is designed to extend the analytical validity of the calibration curve to the value represented by the highest calibrator, which is approximately 1,000 pg/mL. Hence, patient samples with calcitonin > 300 pg/mL can be quantified against a calibration curve consisting of the readings all the way up to the concentration equivalent to the highest calibrator using the 405 nm reading, away from the wavelength of maximum absorbance. In general, patient and control samples should be read using the 450 nm for calcitonin concentrations up to 300 pg/mL. Calcitonin concentrations above 300 pg/mL should be interpolated using the 405-nm reading.

11. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct a calibration curve via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of the calcitonin.

9.1 Procedural Notes

- Calcitonin 1-32 is a very labile molecule. Set up the assay immediately upon the reconstitution or the thawing of all calibrators, controls, and patient samples.
- It is recommended that all calibrators, controls, and patient samples are assayed in duplicate. The average absorbance units of duplicate sets should then be used for reduction of data and the calculation of results.
- The samples should be pipetted into the well with minimum amount of air-bubble. To achieve this, “reverse pipet” described in the package insert of the manufacturers of Pipettors is recommended.
- Patient samples with values greater than the highest calibrator (Calibrator F), which is approximately 1,000 pg/mL (see exact concentration on vial label), may be diluted with Calibrator A (Zero Calibrator) and reassayed. Multiply the result by the dilution factor.
- Reagents from different lot numbers must not be interchanged.
- If preferred, mix in equal volumes, in sufficient quantities for the assay, Reagent 1 (Biotinylated Antibody) and Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) in a clean amber bottle. The combined reagent is stable for seven (7) days when stored at 4 °C. Then use 100 µL of the mixed antibody into each well. This alternative method should replace Step (3) and (4), to be followed with the incubation with orbital shaker.
- When mixing avoid splashing of reagents from wells. This will affect assay precision and accuracy.

10 CALCULATION OF RESULTS

10.1 Manuel Method

1. For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using the three calibrators with the highest concentrations, i.e. Calibrators D, E and F.
2. Assign the concentration for each calibrator stated on the vial in pg/mL. Plot the data from the calibration curve on linear graph paper with the concentration on the X-axis and the corresponding A.U. on the Y-axis.
3. Draw a straight line between 2 adjacent points. This mathematical algorithm is commonly known as the "point-to-point" calculation. Obtain the concentration of the sample by locating the absorbance unit on the Y-axis and finding the corresponding concentration value on the X-axis. Patient and control samples should be read using the 450 nm for Calcitonin concentrations up to 300 pg/mL. Calcitonin concentrations above 300 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.

10.2 Automated Method

Computer programs using cubic spline or 4 PL [4 Parameter Logistics] or Point-to-Point can generally give a good fit.

Sample Data at 450 nm [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	Calcitonin pg/mL	Calcitonin pg/mL –Result to report
Calibrator A	0.008	0.009	0.0085		0
Calibrator B	0.059	0.064	0.0615		10
Calibrator C	0.186	0.194	0.190		30
Calibrator D	0.578	0.602	0.590		100
Calibrator E	1.900	1.882	1.891		300
Control 1	0.127	0.122	0.125	20.6	20.6
Control 2	2.554	2.565	2.560	> 300	*
Patient Sample 1	0.034	0.040	0.037	4.7	4.7
Patient Sample 2	0.104	0.098	0.101	16.3	16.3
Patient Sample 3	0.397	0.411	0.404	68.7	68.7
Patient Sample 4	2.195	2.173	2.184	> 300	*

* Because the concentration readout is > 300 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 405 nm as shown in **Sample Data at 405 nm** in the table below.

Sample Data at 405 nm [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	Calcitonin pg/mL	Calcitonin pg/mL –Result to report
Calibrator A	0.005	0.005	0.005		0
Calibrator D	0.187	0.198	0.193		100
Calibrator E	0.602	0.597	0.599		300
Calibrator F	1.898	1.910	1.904		1000
Control 1	0.045	0.044	0.045	< 300	†
Control 2	0.814	0.816	.815	403	403
Patient Sample 1	0.016	0.020	0.018	< 300	†
Patient Sample 2	0.039	0.035	0.037	< 300	†
Patient Sample 3	0.128	0.134	0.131	< 300	†
Patient Sample 4	0.697	0.689	0.693	345	345

† For samples with readout < 300 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 450 nm as shown in **Sample Data at 450 nm** in the table above. This practice should give the results with optimum sensitivity of the assay.

NOTE: The data presented are for illustration purposes only and must not be used in place of data generated at the time of the assay.

11 QUALITY CONTROL

Control serum or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

12 LIMITATION OF THE PROCEDURE

- The DRG Calcitonin ELISA kit has exhibited no “high dose hook effect” with samples spiked with 1,000,000 pg/mL of pure intact calcitonin (1-32). The spiked sample gave a result greater than the highest standard, i.e. 1,000 pg/mL. Samples with calcitonin levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and reassayed for correct values.
- Like any analyte used as a diagnostic adjunct, calcitonin results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests.
- Supplements containing high biotin levels such as those marketed for hair, skin, and nail benefits, may contain interfering biotin amounts. Biotin levels higher than the recommended daily allowance may cause interference with the assay. Therefore, it is important to communicate with health care providers and patients about biotin intake when collecting samples to prevent incorrect test results. Results show that the highest concentration at which no significant interference was observed is 2 ng/mL of D-Biotin.
- Samples from patients routinely exposed to animal or animal serum products may contain heterophilic antibodies causing atypical results. This assay has been formulated to mitigate this risk of this type of interference. However, potential interactions between rare sera and test components can occur.

13 EXPECTED VALUES

It is recommended that each laboratory establish its own reference range. The data provided should be used only as a guideline. Calcitonin levels were measured in fifty-nine (59) apparently normal female individuals and fifty-two (52) apparently normal male individuals with the DRG Calcitonin ELISA.

The values obtained on the normal females ranged from 0.1 to 10.9 pg/mL and the values obtained on the normal males ranged from 0.2 to 27.7 pg/mL.

Based on statistical tests on skewness and kurtosis, the population, when transformed logarithmically, follows the normal or Gaussian distribution.

The geometric mean \pm 2 standard deviations of the mean for the normal females were calculated to be 0.07 to 12.97 pg/mL and 0.68 to 30.26 pg/mL for the normal males.

Consistent with the literature [2,9], calcitonin levels were found to be generally lower in normal females than in normal males. Hence, the reference range should be less than 13 and 30 pg/mL, for females and males, respectively.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Accuracy

Seventy-seven patient samples, with calcitonin values ranging from 0.8 to 3,113 pg/mL were assayed by the DRG ELISA procedure and an ImmunoRadioMetric Assay Calcitonin (IRMA Kit). Linear regression analysis gives the following statistics:

$$\text{DRG ELISA} = 0.940 \text{ IRMA Kit} + 6.55 \text{ pg/mL} \quad r = 0.993, \quad N = 123$$

Further, fifty-one patient samples, with calcitonin values ranging from < 0.7 to 2,240 pg/mL were assayed by the DRG ELISA procedure and Chemiluminescence Immunoassay for Calcitonin Kit [or ImmunoChemiluminescentMetricAssay (ICMA)]. Linear regression analysis gives the following statistics:

$$\text{DRG ELISA} = 1.094 \text{ ICMA Kit} - 6.13 \text{ pg/mL} \quad r = 0.995, \quad N = 123$$

14.2 Sensitivity

The sensitivity, or minimum detection limit, of this assay is defined as the smallest single value, which can be distinguished from zero at the 95% confidence limit.

The DRG Calcitonin ELISA has a calculated sensitivity of 1.0 pg/mL.

14.3 Precision and Reproducibility

The precision (intra-assay variation) of the DRG Calcitonin ELISA Test was calculated from 20 replicate determinations on each of the three samples.

Intra-Assay Variation

Sample	Mean Value (pg/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	24.3	20	5.7
B	94.9	20	4.3
C	403	20	2.8

The total precision (inter-assay variation) of the DRG Calcitonin ELISA Test was calculated from data on three samples obtained in 15 different assays, by three technicians on two different lots of reagents, over a three-week period.

Inter-Assay Variation

Sample	Mean Value (pg/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	16.5	15	7.4
B	64.5	15	7.4
C	340	15	6.1

14.4 Recovery

Various amounts of Calcitonin were added to four different patient sera to determine the recovery. The results are described in the following table:

Serum Sample	Endogenous Calcitonin (pg/mL)	Calcitonin added (pg/mL)	Expected Value (pg/mL)	Measured Value (pg/mL)	Recovery (%)
A	0	--	--	--	--
	0	100	100	110	110%
	0	200	200	217	109%
B	9.7	--	--	--	--
	8.7	100	109	106	97%
	7.8	200	208	207	100%
C	0	--	--	--	--
	0	100	100	104	104%
	0	200	200	205	103%
D	5.7	--	--	--	--
	5.1	126	131	119	91%
	4.6	220	225	203	90%

14.5 Specificity and Cross-Reactivity

Cross reactant	Concentration of Cross reactant	Calcitonin without Cross reactant (pg/mL)	Calcitonin with Cross reactant (pg/mL)	Change in Calcitonin (pg/mL)	Cross reactivity (%)
PTH	100,000 pg/mL	186	194	8	0.00800
	30,000 pg/mL	186	200	14	0.04667
	10,000 pg/mL	186	194	8	0.08000
Calcitonin Gene Related Peptide	1,000,000 pg/mL	200	202	2	0.00020
	100,000 pg/mL	200	204	4	0.00400
Salmon Calcitonin	1,000,000 pg/mL	191	194	3	0.00030
	100,000 pg/mL	191	199	8	0.00800
TSH	5000 µIU/mL	198	203	5	0.00061
	500 µIU/mL	198	198	0	0.00000
	50 µIU/mL	198	199	1	0.01220

Each cross reactant is spiked into a sample containing Calcitonin. Calcitonin level is measured before and after the spike. None of the cross reactants interfere with this Calcitonin ELISA. The small changes in Calcitonin measured are well within the intra-assay precision statistics.

14.6 Kinetic Effect of the Assay

To determine whether there is any systematic kinetic effect between the beginning of the run and the end of the run, three spiked patient serum pools, selected to represent a good cross section of the calcitonin concentration, were placed in sequence throughout the run of one microplate or 96 wells [with twelve 8-well strips].

14.7 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism

Six patient serum samples were diluted with Calibrator A (Zero Calibrator). Results in pg/mL are shown below:

Sample	Dilution	Expected (E)	Observed (O)	% O/E
A	Undiluted	-	343	-
	1:2	172	168	98%
	1:4	85.8	81.3	95%
	1:8	42.9	40.3	94%
B	Undiluted	-	271	-
	1:2	136	131	97%
	1:4	67.8	70	103%
	1:8	33.9	34.3	101%
C	Undiluted	-	265	-
	1:2	133	134	101%
	1:4	66	70.4	106%
	1:8	33.1	32.5	98%
D	Undiluted	-	>1000	-
	1:2	-	1060	-
	1:4	530	504	95%
	1:8	265	271	102%
E	Undiluted	-	231	-
	1:2	116	116	100%
	1:4	57.8	58.8	102%
	1:8	28.9	27.1	94%
	1:16	14.4	12.1	84%
F	Undiluted	-	>1000	-
	1:2	-	997	-
	1:4	499	429	86%
	1:8	249	223	89%
	1:16	125	119	95%

1 VERWENDUNGSZWECK

Der Calcitonin ELISA dient der quantitativen Bestimmung von Calcitonin in Humanserum. Dieser Assay ist für die in vitro-Diagnostik vorgesehen.

2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Calcitonin, ein Polypeptid aus 32 Aminosäuren, wird primär von den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse abgegeben. Seine biologische Hauptwirkung ist die Hemmung der osteoklastischen Knochenresorption. Auf Grund dieser Eigenschaft wird Calcitonin bei Erkrankungen eingesetzt, die durch eine vermehrte Resorption gekennzeichnet sind, wie das Paget-Syndrom, und bei einigen Patienten mit Osteoporose.

3 KLINISCHE BEDEUTUNG

Das auffälligste, mit einer krankhaften Hypersekretion von Calcitonin einhergehende klinische Syndrom ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC). MTC ist ein Tumor der Calcitonin-produzierenden C-Zellen der Schilddrüse. Obwohl MTC selten ist und nur 5 - 10% aller Schilddrüsenkarzinome ausmacht, nimmt es häufig einen tödlichen Verlauf. Der Tumor tritt sporadisch oder familiär vererbt als autosomal dominant übertragene Form auf. Auf Grund seiner familiären Vererbung ist MTC von großer klinischer Bedeutung. Darüber hinaus lässt sich MTC mittels Serumcalcitonin frühzeitig diagnostizieren. Eine vollständige Heilung früher subklinischer Erkrankungen ist möglich (1). MTC geht häufig mit anderen klinischen Merkmalen einher. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Heilung mittels operativen Eingriffs. Selten kann der Tumor familiär vererbt (1,3,4) als multiple endokrine Neoplasie Typ II auftreten. Diese Tumoren verursachen typischerweise diagnostisch erhöhte Serumkonzentrationen von Calcitonin. Daher kann mit einem Immunoassay zum Nachweis von Calcitonin im Serum die Diagnose von MTC mit einem außergewöhnlichen Grad der Genauigkeit und Spezifität gestellt werden. Bei dieser geringen, aber zunehmenden Anzahl von Patienten sind die basalen Hormonspiegel von normalen Werten jedoch nicht zu unterscheiden¹. Einige dieser Patienten weisen frühe Formen einer C-Zell-Neoplasie oder -Hyperplasie auf, die leicht durch operative Eingriffe beseitigt werden können. Um diese Personen mit Erkrankungen im Frühstadium zu ermitteln, sind Provokationstests zur Calcitonin-Sekretion erforderlich. Damit lassen sich falsch-negative Ergebnisse wie durch eine rein basale Calcitonin-Bestimmung ausschließen. Die meisten Tumoren reagieren mit einem erhöhten Calcitonin-Spiegel auf die Gabe von entweder Calcium (5) oder Pentagastrin (6) oder deren kombinierte Verabreichung (7). Jede der Substanzen kann jedoch irreführende Resultate ergeben. Aus diesem Grund sollte in Fällen mit klinischen Manifestationen die Verwendung beider Substanzen für diagnostische Tests in Betracht gezogen werden. Calcitonin-Messungen können darüber hinaus zur Therapieeffizienz-Kontrolle bei Patienten mit Calcitonin-produzierenden Tumoren eingesetzt werden. Berichten (8) zufolge können multiple Formen immunoreaktiven Calcitonins in gesunden Personen wie auch Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom festgestellt werden. Diese verschiedenen Formen Calcitonin weisen unterschiedliche Molekulargewichte von 3400 (monomere Form) bis zu 70000 Dalton (polymere Form) auf. Neoplastische Störungen anderer neuroendokriner Zellen können den Calcitonin-Spiegel ebenfalls anheben. Das beste Beispiel für einen solchen Tumor ist das kleinzellige Lungenkarzinom. Andere Tumoren wie Karzinoide und Inzeldrüsentumoren des Pankreas können ebenfalls zu erhöhten Spiegeln von Serumcalcitonin führen. Erhöhte Konzentrationen von Serumcalcitonin wurden auch bei akuter und chronischer Niereninsuffizienz, Hyperkalziurie und Hyperkalzämie festgestellt.

4 TESTPRINZIP

Der Calcitonin Immunoassay ist ein an zwei Stellen ansetzender ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] zur Messung des biologisch intakten, 32 Aminosäuren langen Calcitonins. Im Test werden zwei verschiedene monoklonale Antikörper gegen humanes Calcitonin verwendet, die für hinreichend definierte Regionen des Calcitonin-Moleküls spezifisch sind. Ein Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen Calcitonin 11-23. Dieser Antikörper ist biotinyliert. Der andere Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen Calcitonin 21-32. Dieser Antikörper ist als Detektionsantikörper mit Meerrettich-Peroxidase [HRP] markiert.

Streptavidin-beschichtete Vertiefung – Biotinyliertes Anti-Calcitonin 11-23 - Intaktes Calcitonin – HRP-gekoppeltes Anti-Calcitonin (21-32)

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Dadurch bildet das Calcitonin in der Probe einen „Sandwich-Komplex“ mit den beiden Antikörpern. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten.

Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des Calcitonins in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die Calcitonin-Konzentrationen in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt.

5 TESTKIT-KOMPONENTEN

Testkit -Komponenten	Bezeichnung	Menge
RGT 1 = Reagenz 1	Biotinylierter Calcitonin-Antikörper	1 x 7,0 mL
RGT 2 = Reagenz 2	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter Calcitonin-Antikörper	1 x 7,0 mL
RGT 3 = Reagenz 3	Rekonstitutionslösung mit EDTA	1 x 10 mL
RGT A = <i>ELISA</i> Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergens]	1 x 30 mL
RGT B = <i>ELISA</i> Reagenz B	TMB-Substrat [Tetramethylbenzidin]	1 x 20 mL
SOLN = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N Schwefelsäure]	1 x 20 mL
PLA = Mikrotiterplatte	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen à 8 Vertiefungen
CAL = Kalibratoren A: 0 pg/mL B – F: Genau Konzentrationen auf Flaschenetiketten	Lyophilisiertes synthetisches h- Calcitonin. Lyophilisierter Nullkalibrator [BSA-Lösung]. Alle anderen Kalibratoren enthalten synthetisches h- Calcitonin 1-32 in BSA-Lösung, kalibriert gegen den „WHO Calcitonin International Standard“ (<i>WHO 2nd IS 89/620</i>).	1 x 2 mL für den Nullkalibrator 1 x 1 mL für alle anderen Kalibratoren
CTRL = Kontrollen 1 & 2 Genau Bereiche auf Flaschenetiketten	Lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h- Calcitonin 1-32 in BSA-Lösung.	1 x 1 mL je Level

5.1 Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Absorptionsmessung bei Wellenlängen von 450 nm und 405 nm
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 50, 100 und 150 µL
- (Optional): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 50, 100 und 150 µL
- Mikrotiterplattenschüttler: DRG hat die folgenden Drehzahleinstellungen für die einzelnen Schütteldurchmesser ermittelt, bei denen die Streptavidin-Kits ihre optimale Leistungsreaktion behalten:

Mikrotiterplattenschüttler	Schütteldurchmesser	Drehzahleinstellung
Orbital	3 mm (0,1118 in)	600 ± 10 U/min
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 U/min
Linear	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 U/min

6 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieses Testkits sind spezifisch so beschaffen, dass sie keine humanen Blutkomponenten enthalten. In den humanen Patientenproben kann das Vorhandensein von HBsAg, HBcAg bzw. HIV-Antikörpern jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Die bei ungetesteten Patientenproben üblichen Vorsichtsmaßnahmen gelten auch für den Umgang mit diesem Material.

Die Stopplösung besteht aus 1 N Schwefelsäure. Dies ist eine starke Säure. Obwohl sie verdünnt ist, ist sie mit Sorgfalt zu handhaben. Sie kann Verätzungen verursachen. Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Schutzkleidung sind zu tragen. Verschüttete Säure ist vor dem Aufwischen mit großen Mengen Wasser zu verdünnen. Dämpfe nicht einatmen.

Wenn eine Trübung in einem Reagenz beobachtet wird, führen Sie keinen Assay durch und kontaktieren Sie Ihren Lieferanten.

Im Handel sind verschiedene Schüttlertypen mit unterschiedlichen technischen Daten erhältlich. Falls der im Labor eingesetzte Mikrotiterplattenschüttler andere als die oben angegebenen Daten aufweist, sollten Sie selbst die optimale Einstellung ermitteln.

7 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung des Calcitonins sollte mit Serum erfolgen. Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, werden 200 µL Serum benötigt. Vollblut ohne Antikoagulanzen sammeln. Nach Gerinnung des Bluts ist das Serum sofort zu trennen, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, und bei -20 °C oder kälter zu lagern.

Stark hämolytische, lipämische oder ikterische Proben sind zu vermeiden.

8 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Nach Zustellung und vor Verwendung alle Testkit-Komponenten bei 2 °C - 8 °C lagern.

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. Standard A (Nullstandard) mit 2,0 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Standard B bis F und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 1,0 mL des Reagenz 3 (Rekonstitutionslösung) rekonstituieren und mischen.
Flaschen 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen.
Standards und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Standards und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich in einem Gefrierschrank ohne automatische Abtauung einzufrieren (-20 °C). Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -20 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.
3. **ELISA Reagenz A:** Waschkonzentrat: Inhalt gründlich mischen. Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist das Präzipitat durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad oder einen Laborofen bei 37 °C und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 mL) zu 570 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

9 TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Qualitätskontrollseren und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen. Lassen Sie mindestens zwei Vertiefungen frei für den Leerwert. Siehe Schritt 10.
 2. **100 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen bzw. gekennzeichneten Vertiefungen pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).**
 3. **50 µL** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
 4. **50 µL** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten.
 5. Platte **4 Stunden ± 30 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem Schüttler inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt 5.1).
 6. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Vertiefungen **5-mal** mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät **waschen**/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf 0,35 mL je Vertiefung einzustellen.
 7. **150 µL** des ELISA Reagenz B (TMB-Substrat) in jede der Vertiefungen pipettieren, außer in die Vertiefungen, die für den Leerwert vorgesehen sind.
 8. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt 5.1).
 9. **100 µL** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren, außer in die Vertiefungen, die für den Leerwert vorgesehen sind. Vorsichtig mischen.
 10. Vor Beginn der Messung sicherstellen, dass die beiden für den Leerwert vorgesehenen Vertiefungen (siehe Schritt # 1), mit 250 µL destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllt sind. Nach Anleitung des Herstellers und unter Verwendung der Leerwert-Vertiefungen einen Nullabgleich des Mikrotiterplatten-Lesegerätes durchführen.* Innerhalb von 10 Minuten die Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmen. Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen.
* Falls es aus technischen Gründen nicht möglich ist, einen Nullabgleich des Mikrotiterplatten-Lesegerätes durchzuführen, subtrahieren Sie den Absorptionswert des Leerwertes jeweils von allen anderen Absorptionswerten, um die Ergebnisse zu erhalten.
- Hinweis:** Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 1000 pg/mL) auszudehnen. Somit können Patientenproben mit Calcitonin > 300 pg/mL gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Im Allgemeinen sind Patienten- und Kontrollproben bei Calcitonin-Konzentrationen von bis zu 300 pg/mL bei 450 nm abzulesen. Calcitonin-Konzentrationen oberhalb von 300 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.
11. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte kann eine Kalibrationskurve mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der Calcitonin-Konzentration erstellt werden.

9.1 Verfahrenstechnische Hinweise

- Calcitonin 1-32 ist ein sehr instabiles Molekül. Sofort nach Rekonstitution bzw. Auftauen sämtlicher Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit dem Test beginnen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen. Für die Datenreduktion und die Berechnung der Ergebnisse sind dann die mittleren Absorptionseinheiten der doppelbestimmten Reihen zu verwenden.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden. Dies wird durch Umkehren des Pipettiervorgangs erreicht, wie in der Pipetten-Packungsbeilage beschrieben.
- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) von ca. 1000 pg/mL (genaue Konzentrationsangabe auf dem Flaschenetikett) sind mit Kalibrator A (Nullkalibrator) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Nur Reagenzien einer Charge verwenden.

- Alternativ können für den Test ausreichende Mengen Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) und Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) zu gleichen Teilen in einer sauberen brauntransparenten Flasche gemischt werden. Bei Lagerung bei 4 °C ist das Mischreagenz sieben (7) Tage stabil. Anschließend 100 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4). Darauf folgt die Inkubation im Orbitalschüttler.
- Beim Mischen ist ein Verschütten der Reagenzien aus den Vertiefungen zu vermeiden. Sorgfältiges Arbeiten ist für die Präzision des Tests und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

10.1 Manuell

1. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d.h. Kalibrator **A, B, C, D und E**.
Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der drei Kalibratoren mit den höchsten Konzentrationen, d.h. Kalibrator **D, E und F**.
2. Jedem Kalibrator die auf dem Fläschchen in pg/mL angegebene Konzentration zuweisen. Daten der Kalibrationskurve auf Millimeterpapier übertragen, wobei die Konzentration auf der X-Achse gegen die entsprechende Absorptionseinheit auf der Y-Achse aufzutragen ist.
3. Zwei nebeneinander liegende Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Dieser mathematische Algorithmus wird als lineare Interpolation bezeichnet. Die Probenkonzentration ist durch Feststellung der Absorptionseinheit auf der Y-Achse und des zugehörigen Konzentrationswerts auf der X-Achse zu ermitteln. Patienten- und Kontrollproben sind bei Calcitonin-Konzentrationen von bis zu 300 pg/mL bei 450 nm abzulesen. Calcitonin-Konzentrationen oberhalb von 300 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

10.2 Automatisch

Computerprogramme, die mit kubischen Spline, 4 PL [4-Parameter Logistik] oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation arbeiten, liefern erfahrungsgemäß gute Ergebnisse.

Beispieldaten bei 450 nm [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit (OD) gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

	1. Messung OD	2. Messung OD	Mittelwert OD	Calcitonin pg/mL	Calcitonin pg/mL – Anzugebendes Ergebnis
Standard A	0.008	0.009	0.0085		0
Standard B	0.059	0.064	0.0615		10
Standard C	0.186	0.194	0.190		30
Standard D	0.578	0.602	0.590		100
Standard E	1.900	1.882	1.891		300
Kontrolle 1	0.127	0.122	0.125	20.6	20.6
Kontrolle 2	2.554	2.565	2.560	> 300	*
Patientenprobe 1	0.034	0.040	0.037	4.7	4.7
Patientenprobe 2	0.104	0.098	0.101	16.3	16.3
Patientenprobe 3	0.397	0.411	0.404	68.7	68.7
Patientenprobe 4	2.195	2.173	2.184	> 300	*

* Da die gemessene Konzentration > 300 pg/mL ist, sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter Beispieldaten bei 405 nm aufgeführt sind.

Beispieldaten bei 405 nm [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit (OD) gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

	1. Messung OD	2. Messung OD	Mittelwert OD	Calcitonin pg/mL	Calcitonin pg/mL – Anzugebendes Ergebnis
Standard A	0.005	0.005	0.005		0
Standard D	0.187	0.198	0.193		100
Standard E	0.602	0.597	0.599		300
Standard F	1.898	1.910	1.904		1000
Kontrolle 1	0.045	0.044	0.045	< 300	¶
Kontrolle 2	0.814	0.816	.815	403	403
Patientenprobe 1	0.016	0.020	0.018	< 300	¶
Patientenprobe 2	0.039	0.035	0.037	< 300	¶
Patientenprobe 3	0.128	0.134	0.131	< 300	¶
Patientenprobe 4	0.697	0.689	0.693	345	345

¶ Für Proben mit einem Messwert < 300 pg/mL sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, wie sie oben in der Tabelle Beispieldaten bei 450 nm aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.

HINWEIS: Die verwendeten Daten dienen lediglich zur Illustration. Sie sind nicht anstelle der während der Testdurchführung ermittelten Daten zu verwenden.

11 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollseren oder Serumpools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mithilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Liegen bei einem Test einer oder mehrere der Werte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, sind die Ergebnisse der Patientenproben möglicherweise ungültig.

12 GRENZEN DES VERFAHRENS

Der Calcitonin ELISA zeigt keinen „High-dose-hook-Effekt“ bei Proben, die mit 1.000.000 pg/mL reinem intaktem Calcitonin 1-32 versetzt sind. Die versetzte Probe ergab einen Wert oberhalb des höchsten Standards von 1.000 pg/mL. Proben mit Calcitonin-Konzentrationen höher als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind Calcitonin-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren.

Durch die Einnahme von Biotin-Nahrungsergänzungsmitteln, die das Erscheinungsbild von Haaren, Haut und Nägeln verbessern sollen, können die Ergebnisse des Assays beeinflusst werden, wenn die empfohlene Biotin-Tagesdosis überschritten wird. Daher müssen bei der Probennahme Gesundheitsdienstleister und Patienten hinsichtlich der Einnahme von Biotin befragt werden, um falsche Untersuchungsergebnisse zu vermeiden. Die Ergebnisse zeigen, dass die höchste Konzentration, bei der keine signifikante Interferenz beobachtet wurde, bei 2 ng/mL D-Biotin liegt.

Proben von Patienten, die regelmäßig Tier- oder Tierserumprodukten ausgesetzt sind, können heterophile Antikörper enthalten, welche zu atypischen Ergebnissen führen. Dieser Assay wurde so formuliert, dass das Risiko einer solchen Art der Ergebnisbeeinflussung abgeschwächt ist. Dennoch können Wechselwirkungen zwischen seltenen Seren und Testkomponenten auftreten.

13 ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwerte ermitteln. Die angegebenen Referenzbereiche sollten nur als Richtlinie dienen.

Mithilfe des Calcitonin ELISA wurden in neunundfünfzig (59) scheinbar gesunden weiblichen Probanden und zweiundfünfzig (52) scheinbar gesunden männlichen Probanden Calcitonin-Konzentrationen gemessen.

Die ermittelten Werte lagen bei den scheinbar gesunden weiblichen Probanden in einem Bereich von 0,1 bis 10,9 pg/mL und bei den scheinbar gesunden männlichen Probanden in einem Bereich von 0,2 bis 27,7 pg/mL.

Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzessverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung.

Das geometrische Mittel + 2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab für die scheinbar gesunden Frauen einen Bereich von 0,07 bis 12,97 pg/mL und für die scheinbar gesunden Männer einen Bereich von 0,68 bis 30,26 pg/mL.

In Übereinstimmung mit der Literatur (2,9) lagen die für die scheinbar gesunden Frauen ermittelten Calcitonin-Konzentrationen im Allgemeinen unter den für die scheinbar gesunden Männer ermittelten Konzentrationen.

Daher sollte der Referenzbereich für Frauen unterhalb 13 pg/mL und für Männer unterhalb von 30 pg/mL liegen.

14 LEISTUNGSMERKMALE

14.1 Genauigkeit

Siebenundsiebzig (77) Patientenproben mit Calcitonin-Werten zwischen 0,8 und 3,113 pg/mL wurden mit dem DRG ELISA Verfahren und einem Calcitonin Immunoradiometrischen Assay (IRMA) getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

$$\text{DRG ELISA} = 0.940 \text{ IRMA Kit} + 6.55 \text{ pg/mL} \quad r = 0.993$$

Weitere einundfünfzig (51) Patientenproben mit Calcitonin-Werten < 0,7 bis 2 240 pg/mL wurden mit dem DRG ELISA Verfahren und einem Calcitonin Chemilumineszenz-Immunoassay [ImmunoChemiluminescentMetric Assay (ICMA)] getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

$$\text{DRG ELISA} = 1.094 \text{ ICMA Kit} - 6.13 \text{ pg/mL} \quad r = 0.995$$

14.2 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze dieses Tests ist als der kleinste Wert definiert, der auf Basis des 95%-Vertrauensbereichs vom Nullstandard unterschieden werden kann. Der Calcitonin ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,0 pg/mL.

14.3 Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision (Intra-Assay-Abweichung) des Calcitonin ELISA wurde durch 20 wiederholte Messungen jeder der drei Proben ermittelt.

Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	24.3	20	5.7
B	94.9	20	4.3
C	403	20	2.8

Die Gesamtpräzision (Inter-Assay-Abweichung) des Calcitonin ELISA wurde durch die Bestimmung von drei Proben in 15 Testansätzen ermittelt. Die Tests wurden über einen Zeitraum von drei Wochen von drei Labortechnikern unter Verwendung von Reagenzien aus zwei verschiedenen Chargen durchgeführt.

Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	16.5	15	7.4
B	64.5	15	7.4
C	340	15	6.1

14.4 Wiederfindung

Vier verschiedene Patientenseren wurden zur Bestimmung der Wiederfindung mit unterschiedlichen Mengen Calcitonin versetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Serum Sample	Endogenes Calcitonin (pg/mL)	Calcitonin zugegeben (pg/mL)	Erwarteter Wert (pg/mL)	Gemessener Wert (pg/mL)	Wiederfindung (%)
A	0	--	--	--	--
	0	100	100	110	110%
	0	200	200	217	109%
B	9.7	--	--	--	--
	8.7	100	109	106	97%
	7.8	200	208	207	100%
C	0	--	--	--	--
	0	100	100	104	104%
	0	200	200	205	103%
D	5.7	--	--	--	--
	5.1	126	131	119	91%
	4.6	220	225	203	90%

14.5 Spezifität und Kreuzreaktivität

Kreuz-Reaktant	Konzentration des Kreuz-Reaktant	Calcitonin ohne Kreuz-Reaktant (pg/mL)	Calcitonin mit Kreuz-Reaktant (pg/mL)	Änderung des Calcitonin (pg/mL)	Kreuzreaktion (%)
PTH	100,000 pg/mL	186	194	8	0.00800
	30,000 pg/mL	186	200	14	0.04667
	10,000 pg/mL	186	194	8	0.08000
Calcitonin Gene Related Peptide	1,000,000 pg/mL	200	202	2	0.00020
	100,000 pg/mL	200	204	4	0.00400
Lachs Calcitonin	1,000,000 pg/mL	191	194	3	0.00030
	100,000 pg/mL	191	199	8	0.00800
TSH	5000 µIU/mL	198	203	5	0.00061
	500 µIU/mL	198	198	0	0.00000
	50 µIU/mL	198	199	1	0.01220

Jeder Kreuzreaktant wird in eine Calcitonin enthaltende Probe gegeben. Die Calcitonin-Konzentration wird vor und nach der Zugabe gemessen. In diesem Calcitonin ELISA war keine signifikante Querempfindlichkeit nachweisbar. Die gemessenen geringfügigen Veränderungen des Calcitonins liegen innerhalb des Wertebereichs der Intra-Assay-Präzision.

14.6 Kinetischer Effekt des Assays

Um einen systematischen kinetischen Effekt auszuschließen, wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende der gesamten Mikrotiterplatte [bei 12 Streifen à 8 Vertiefungen, d.h. 96 Vertiefungen] drei „gespikete“ Patientenserumpools pipettiert. Die Auswahl der Pools erfolgte im Sinne eines guten Querschnitts der enthaltenen Calcitonin-Konzentrationen.

14.7 Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität

Sechs Patientenserumproun wurden mit Kalibrator A (Nullkalibrator) verdünnt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in pg/mL dargestellt:

Probe	Verdünnung	Erwartet (E)	Gemessen (G)	% G/E
A	Unverdünnt	-	343	-
	1:2	172	168	98%
	1:4	85.8	81.3	95%
	1:8	42.9	40.3	94%
B	Unverdünnt	-	271	-
	1:2	136	131	97%
	1:4	67.8	70	103%
	1:8	33.9	34.3	101%
C	Unverdünnt	-	265	-
	1:2	133	134	101%
	1:4	66	70.4	106%
	1:8	33.1	32.5	98%
D	Unverdünnt	-	>1000	-
	1:2	-	1060	-
	1:4	530	504	95%
	1:8	265	271	102%
E	Unverdünnt	-	231	-
	1:2	116	116	100%
	1:4	57.8	58.8	102%
	1:8	28.9	27.1	94%
	1:16	14.4	12.1	84%
F	Unverdünnt	-	>1000	-
	1:2	-	997	-
	1:4	499	429	86%
	1:8	249	223	89%
	1:16	125	119	95%

1 USO PREVISTO

Il test calcitonina ELISA DRG è volto alla determinazione quantitativa di calcitonina nel siero umano. Questo tipo di analisi è destinato all'impiego diagnostico *in vitro*.

2 RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La calcitonina, un polipeptide costituito da 32 aminoacidi, è secreta principalmente dalle cellule parafollicolari (cellule C) della tiroide. Il suo effetto biologico fondamentale è l'azione inibitoria sul riassorbimento osseo osteoclastico. Grazie a tale proprietà, la calcitonina trova impiego terapeutico per i disturbi caratterizzati da un aumento del riassorbimento, come il morbo di Paget, e per certi tipi di osteoporosi.

3 SIGNIFICATO CLINICO

La sindrome clinica più rilevante associata a una ipersecrezione anomala di calcitonina è il carcinoma midollare della tiroide (MTC). Si tratta di un tumore delle cellule C della tiroide, deputate alla secrezione di calcitonina. Nonostante si tratti di una neoplasia rara (il 5 ~ 10% di tutti i tumori tiroidei), l'MTC ha spesso un esito fatale. Può insorgere in modo sporadico oppure in forma familiare trasmessa a livello ereditario come carattere autosomale dominante. A causa dell'incidenza ereditaria, l'MTC è di notevole importanza clinica. Inoltre può essere diagnosticato precocemente mediante la determinazione di calcitonina nel siero e nella forma subclinica può essere completamente curato¹. Il carcinoma midollare della tiroide è spesso associato ad altre caratteristiche cliniche e ha una buona potenzialità di cura con il trattamento chirurgico. Nonostante si tratti di un tumore raro, può insorgere su base familiare^{1,3,4} come neoplasia endocrina multipla di tipo 2. Poiché queste neoplasie in genere producono concentrazioni di calcitonina nel siero diagnosticamente elevate, il saggio immunoenzimatico della calcitonina nel siero può essere impiegato per diagnosticare la presenza di MTC con un alto livello di accuratezza e specificità. Tuttavia, in una percentuale di pazienti modesta ma in crescita, i livelli basali di ormoni non sono distinguibili da quelli normali¹. Alcuni di questi soggetti, che manifestano le prime fasi della neoplasia o iperplasia delle cellule C, sono i migliori candidati per il trattamento chirurgico. Per identificare i pazienti nella fase precoce della patologia, sono necessari test provocativi della secrezione di calcitonina per escludere falsi negativi nel caso venga eseguita soltanto la determinazione della calcitonina basale. Con un maggior livello di calcitonina, la maggior parte dei tumori risponde alla somministrazione di calcio⁵ o pentagastrina⁶ o di una combinazione di entrambi⁷, tuttavia uno dei due agenti può produrre risultati fuorvianti. Pertanto, in casi con manifestazioni cliniche, per l'analisi diagnostica dovrebbero essere considerati entrambi gli agenti. La misurazione della calcitonina può essere usata anche per monitorare l'efficacia della terapia in pazienti con tumori secernenti calcitonina.

Sono stati riportati casi⁸ di forme multiple di calcitonina immunoreattiva in soggetti normali o in pazienti affetti da MTC. Queste varie forme di calcitonina hanno un peso molecolare compreso tra 3.400 (forma monomerica) e 70.000 Dalton (forma polimerica).

L'aumento dei livelli di calcitonina è determinato anche da patologie neoplastiche di altre cellule neuroendocrine. L'esempio più tipico è il carcinoma polmonare a piccole cellule. Vi sono altri tumori, come i carcinoidi e gli adenomi insulari del pancreas, che si traducono in livelli elevati di calcitonina nel siero.

Questi livelli elevati sono rilevabili tra l'altro anche nell'insufficienza renale acuta e cronica, nell'iperocalciuria e nell'ipercalcemia.

4 PRINCIPIO DEL TEST

Il saggio immunoenzimatico calcitonina DRG è un test ELISA (saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato) a doppio anticorpo per la misurazione della catena di 32 aminoacidi biologicamente intatta della calcitonina. Esso impiega due diversi anticorpi monoclonali di topo contro calcitonina umana, specifici per regioni ben definite della molecola della calcitonina. Un anticorpo biotinilato si lega soltanto alla calcitonina 11-23, mentre l'altro anticorpo si lega soltanto con la calcitonina 21-32 ed è marcato con perossidasi di rafano [HRP].

Pozzetto rivestito di streptavidina -- Anti calcitonina biotinilato (11-23) – Calcitonina intatta -- Anti-calcitonina coniugato HRP (21-32)
--

In questo saggio, i calibratori, i controlli o i campioni paziente vengono incubati contemporaneamente con un anticorpo marcato con enzima e con uno coniugato con biotina in un pozzetto per micropiastra rivestita di streptavidina. Quindi la calcitonina nel campione forma un complesso "sandwich" tra i due anticorpi. Al termine dell'incubazione del saggio, il micropozzetto viene lavato per eliminare i residui non legati e l'enzima legato alla fase solida viene incubato con il substrato (tetrametilbenzidina, TMB). In seguito per arrestare la reazione viene aggiunta una soluzione bloccante acida, che conferisce al liquido una colorazione gialla.

L'intensità cromatica è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcitonina nel campione. Sulla base dei risultati ottenuti dai calibratori viene generata una curva di risposta alla dose di unità di assorbanza in relazione alla concentrazione. Le concentrazioni di calcitonina presenti nei controlli e nei campioni paziente sono determinati direttamente da questa curva.

5 COMPONENTI DEL KIT

Componenti del kit	Descrizione	Quantità
RGT 1 = Reagente 1	Anticorpo calcitonina biotinilato	1 x 7.0 mL
RGT 2 = Reagente 2	Anticorpo calcitonina marcato con perossidasi (enzima)	1 x 7.0 mL
RGT 3 = Reagente 3	Soluzione di reconstituzione contenente EDTA	1 x 10 mL
RGT A = Reagente A ELISA	Soluzione di lavaggio concentrata ELISA (fisiologica con tensioattivi)	1 x 30 mL
RGT B = Reagente B ELISA	Substrato TMB [tetrametilbenzidina]	1 x 20 mL
SOLN = Soluzione bloccante	Soluzione bloccante ELISA (1N acido solforico)	1 x 20 mL
PLA = Micropiastro	Contenitore con strisce rivestite di streptavidina	12 strisce per 8 pozzetti
CAL = Calibratori A: 0 pg/mL B - F: Le concentrazioni essate sono riportate sull'eticheta delle provette	h-calcitonina sintetica liofilizzata. Calibratore zero liofilizzato (soluzione BSA). Tutti gli altri calibratori: h-calcitonina (1-32) in soluzione BSA, calibrata secondo lo standard <i>OMS 2nd IA 89/620</i>	1 x 2 mL per calibratore zero 1 x 1 mL per altri calibratori
CTRL = Controlli 1 e 2 I valori essati sono riportati sull'etichetta delle provette	Liofilizzati. 2 livelli. H-calcitonina (1-32) sintetica in soluzione BSA	1 x 1 mL per livello

5.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONE (NON IN DOTAZIONE)

- Lettore per micropiastre in grado di misurare l'assorbanza a lunghezze d'onda di 450 nm e 405 nm.
- Lavatore per micropiastre (il lavaggio manuale è consentito in assenza di un lavatore automatico).
- Pipette di precisione per 50, 100 e 150 µL.
- *Opzionale*: distributore multicanale o a ripetizione per 50, 100 e 150 µL.
- Agitatori per micropiastre: DRG ha rilevato che, con gli agitatori di diametro sotto indicato, i kit di streptavidina manterranno una risposta ottimale alle seguenti impostazioni di velocità:

Agitatori per micropiastre	Diametro di agitazione	Impostazione di velocità
Orbitale	3 mm (0,1118 in)	600 ± 10 giri/minuto
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 giri/minuto
Lineare	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 giri/minuto

6 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Benché i reagenti forniti nel presente kit siano stati studiati in modo da non contenere componenti ematiche umane, i campioni di pazienti che potrebbero risultare positivi agli anticorpi HBsAg, HBcAg o HIV devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente infettivo. Osservare le precauzioni standard nella manipolazione dei campioni, analogamente a quanto previsto per i campioni di pazienti non analizzati.

La soluzione bloccante è un composto di 1 N acido solforico, un forte acido che, anche se diluito, va trattato con grande cautela, poiché può provocare ustioni. Indossare un paio di guanti, occhiali e indumenti protettivi. Lavare immediatamente eventuali versamenti con abbondanti quantità di acqua. Non respirare i vapori ed evitare di inalarli.

Se un reagente appare torbido, non eseguire il test e contattare il fornitore.

Sono disponibili in commercio vari tipi di agitatori con specifiche diverse. Qualora l'agitatore per micropiastre non rientri nell'intervallo sopra specificato, il laboratorio dovrà definire il proprio intervallo ottimale.

7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione di calcitonina deve essere effettuata con il siero.

Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 200 µL di siero. Raccogliere il sangue intero senza anticoagulante. Lasciare coagulare il sangue, quindi separare tempestivamente il siero, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare a una temperatura pari o inferiore a -20 °C. Evitare campioni fortemente emolizzati o lipemici.

8 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

Prima dell'uso conservare tutti i componenti del kit a 2 °C - 8 °C.

1. Tutti i reagenti, tranne i calibratori, i controlli e la soluzione di lavaggio concentrata, sono pronti per l'uso. Conservare tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C.
2. Ricostituire il calibratore A (standard zero) con 2 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Per tutti i calibratori non zero (calibratore B ~ F) e i controlli 1 e 2, ricostituire ciascuna provetta con 1,0 mL di reagente 3 (soluzione di ricostituzione) e mescolare. Incubare le provette per 10 minuti, quindi mescolare abbondantemente agitando delicatamente per inversione per completare la ricostituzione. **Dopo la ricostituzione, usare calibratori e controlli quanto prima. Dopo l'uso, congelare (-20 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti in un congelatore senza scongelamento automatico.** Gli standard e i controlli sono stabili a -20 °C per 6 settimane dopo la ricostituzione, con un massimo di 3 cicli di congelamento - scongelamento, se trattati in base alle raccomandazioni riportate nella sezione "Note sulla procedura".
3. **Reagente A ELISA:** Soluzione di lavaggio concentrata: mescolare abbondantemente il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata. In presenza di un precipitato nella soluzione di lavaggio concentrata, dovuto a conservazione a basse temperature (es. 4 °C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in un forno a 37 °C con agitatore. Aggiungere la soluzione di lavaggio concentrata (30 mL) a 570 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 90 giorni se conservata a temperatura ambiente.

9 PROCEDURA DI ANALISI

1. Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori per calcitonina, A ~ F tra i CALIBRATORI per calcitonina (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), sieri di controllo qualità e campioni paziente. Come minimo, lasciare liberi due pozzetti come "bianchi". Fare riferimento al passo 10 per la lettura finale della micropiastra.
2. Pipettare **100 µL** di calibratori, controlli e campioni nel pozzetto previsto.
Dopo l'uso, congelare (-20 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.
3. Aggiungere o versare **50 µL** di reagente 1 (anticorpo biotilinato) in ciascun pozzetto contenente il calibratori, controlli e campioni.
4. Aggiungere o versare **50 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti.
5. Coprire le micropiastre con una pellicola di alluminio o con una vaschetta per ripararle dalla luce. Posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione 5.1) per **4 ore ± 30 minuti** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
6. Aspirare completamente il liquido, quindi lavare/aspirare ogni pozzetto cinque (5) volte con la soluzione di lavaggio (preparata dal reagente A), mediante un lavatore automatico per micropiastre. Impostare il volume della soluzione di lavaggio in modo che in ciascun pozzetto vengano versati 0,35 mL.
7. Aggiungere o versare **150 µL** di **reagente B ELISA** (substrato TMB) in ogni pozzetto, tranne nei pozzetti vuoti.
8. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione 5.1) per **30 ± 5 minuti** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
9. Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto, tranne nei pozzetti vuoti. Mescolare delicatamente.
10. Prima della lettura, accertarsi che entrambi i "pozzetti bianchi" citati al passaggio 1 siano stati riempiti con 250 µL di acqua distillata o deionizzata.
Azzerare il lettore secondo le istruzioni del produttore utilizzando i pozzetti bianchi. *Leggere l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore per micropiastre impostato su **450 nm**.
Leggere nuovamente la piastra con il lettore impostato a **405 nm** anche contro acqua distillata o deionizzata.

**Se, per motivi tecnici, il lettore ELISA non può essere regolato a zero utilizzando un pozzetto "bianco", per ottenere i risultati sottrarre il valore di assorbanza "bianco" da tutti gli altri valori di assorbanza.*

Nota: la seconda lettura serve ad ampliare la validità analitica della curva di calibrazione al valore rappresentato dal calibratore con il livello massimo, pari a circa 1.000 pg/mL. Per tanto i campioni di pazienti con un livello di calcitonina > 300 pg/mL possono essere quantificati in relazione a una curva di calibrazione, costituita dai valori compresi sino all'equivalente di concentrazione del calibratore più elevato, usando il valore 405 nm, lontano dalla lunghezza d'onda della massima assorbanza. In generale, i campioni paziente e di controllo dovrebbero essere letti usando il valore 450 nm per concentrazioni di calcitonina sino a 300 pg/mL. Concentrazioni di calcitonina superiori a 300 pg/mL devono essere interpolate con il valore 405 nm.

11. Utilizzando i valori di assorbanza finali ottenuti nella fase precedente, costruire una curva di calibrazione mediante interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto per quantificare la concentrazione di calcitonina.

9.1 NOTE SULLA PROCEDURA

- La calcitonina 1-32 è una molecola molto instabile. Preparare quindi il saggio immediatamente dopo la ricostituzione o lo scongelamento di tutti i calibratori, controlli e campioni paziente.
- Si raccomanda di analizzare tutti i calibratori, controlli e campioni paziente in duplicato. Le unità di assorbanza media dei duplicati devono essere impiegate per la riduzione di dati e per il calcolo dei risultati.
- I campioni devono essere pipettati nel pozzetto con la minima quantità possibile di bolle d'aria. A tale fine, si raccomanda di eseguire il "pipettaggio inverso" descritto nelle istruzioni del produttore delle pipette.
- I campioni paziente con valori superiori al calibratore più elevato (calibratore F), pari a circa 1.000 pg/mL (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), possono essere diluiti con il calibratore A (calibratore zero) e rianalizzati. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.
- I reagenti con numeri di partita diversi non devono essere scambiati.
- Eventualmente mescolare, in volumi uguali e in quantità sufficienti per l'analisi, il reagente 1 (anticorpo biotinilato) e il reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) in un flacone pulito color ambra. Il reagente combinato è stabile per sette (7) giorni se conservato a 4 °C. Quindi distribuire 100 µL dell'anticorpo mescolato in ciascun pozzetto. Questo metodo alternativo sostituisce i passaggi (3) e (4) e va seguito dall'incubazione con agitatore orbitale.
- Nella fase di mescolatura evitare di spruzzare i reagenti dai pozzetti, per evitare di pregiudicare la precisione e l'accuratezza dell'analisi.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

10.1 Metodo manuale

1. Per i valori pari a 450 nm, costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando i primi cinque calibratori forniti (calibratori A, B, C, D, E). Per i valori pari a 405 nm, costruire una seconda curva di risposta alla dose, usando i tre calibratori con le concentrazioni più elevate (calibratori D, E, F).
2. Assegnare la concentrazione per ogni calibratore indicata sulla provetta in pg/mL. Su carta a scala lineare, tracciare i dati dalla curva di calibrazione con la concentrazione sull'asse delle ascisse e il corrispondente valore di assorbanza sull'asse delle ordinate.
3. Tracciare una linea retta tra 2 punti adiacenti. Questo algoritmo matematico è noto come calcolo "punto-punto". Ottenere la concentrazione del campione individuando l'unità di assorbanza sull'asse delle ordinate e il corrispondente valore di concentrazione sull'asse delle ascisse. I campioni paziente e di controllo devono essere letti sulla base del valore 450 nm per concentrazioni di calcitonina sino a 300 pg/mL. Concentrazioni di calcitonina superiori a 300 pg/mL devono essere interpolate con il valore 405 nm.

10.2 Metodo automatico

I programmi che utilizzano l'interpolazione con spline cubica, 4 parametri logistici o punto-punto offrono generalmente un buon adattamento.

Dati campione a 450 nm (lettura unità di assorbanza grezze contro acqua istillata o deionizzata)

Pozzetto micropiastra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	Calcitonina pg/mL	Calcitonina pg/mL – Risultado
Calibratore A	0.008	0.009	0.0085		0
Calibratore B	0.059	0.064	0.0615		10
Calibratore C	0.186	0.194	0.190		30
Calibratore D	0.578	0.602	0.590		100
Calibratore E	1.900	1.882	1.891		300
Controllo 1	0.127	0.122	0.125	20.6	20.6
Controllo 2	2.554	2.565	2.560	> 300	*
Campione paziente 1	0.034	0.040	0.037	4.7	4.7
Campione paziente 2	0.104	0.098	0.101	16.3	16.3
Campione paziente 3	0.397	0.411	0.404	68.7	68.7
Campione paziente 4	2.195	2.173	2.184	> 300	*

* Poiché il valore della concentrazione è > 300 pg/mL, si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 405 nm come indicato nei **Dati campioni a 405 nm** nella tabella seguente.

Dati campione a 405 nm (lettura unità di assorbanza grezze contro acqua distillata o deionizzata)

Pozzetto micropiastra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	Calcitonina pg/mL	Calcitonina pg/mL – Risultado
Calibratore A	0.005	0.005	0.005		0
Calibratore D	0.187	0.198	0.193		100
Calibratore E	0.602	0.597	0.599		300
Calibratore F	1.898	1.910	1.904		1000
Controllo 1	0.045	0.044	0.045	< 300	¶
Controllo 2	0.814	0.816	0.815	403	403
Campione paziente 1	0.016	0.020	0.018	< 300	¶
Campione paziente 2	0.039	0.035	0.037	< 300	¶
Campione paziente 3	0.128	0.134	0.131	< 300	¶
Campione paziente 4	0.697	0.689	0.693	345	345

Per i campioni con un valore > 300 pg/mL, si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 450 nm come indicato nei **Dati campioni a 450 nm** nella prima tabella.

Questo metodo fornisce risultati che garantiscono la sensibilità ottimale del saggio.

NOTA: i dati presentati sono forniti esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere utilizzati in sostituzione dei dati generati al momento dell'analisi.

11 CONTROLLO QUALITÀ

Il siero di controllo ed i pool di siero devono essere analizzati con ciascuna seduta di calibratori e di campioni paziente. I risultati generati dall'analisi dei campioni di controllo devono essere valutati per garantirne l'accettabilità mediante metodi statistici idonei. Nei saggi nei quali uno o più valori dei controllo qualità sono al di fuori dei limiti accettabili, i risultati per il campione del paziente potrebbero non essere validi.

12 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il kit calcitonina ELISA (EIA-3648) non rivela un "effetto gancio ad alte dosi" con campioni combinati con 1.000.000 pg/mL di calcitonina nella forma pura e intatta.

Il campione combinato ha prodotto un risultato superiore allo standard più elevato, ossia 1,000 pg/mL. Tuttavia, i campioni con livelli di calcitonina superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti e riesaminati per produrre valori corretti.

Analogamente a qualsiasi analita impiegato come elemento diagnostico aggiuntivo, i risultati della calcitonina vanno interpretati con attenzione, all'interno del quadro clinico complessivo e alla luce di altri test diagnostici correlati.

I supplementi contenenti alti livelli di biotina, come quelli commercializzati per i capelli, la pelle e le unghie, possono contenere una quantità di biotina interferente. Livelli di biotina superiori alla dose giornaliera raccomandata possono interferire con il test ed è pertanto importante discutere con gli operatori sanitari ed i pazienti dell'assunzione di biotina durante la raccolta dei campioni per evitare errori nei risultati. I risultati mostrano che l'interferenza più significativa è stata riscontrata a una concentrazione di D-biotina pari a 2 ng/mL.

I campioni prelevati da pazienti abitualmente esposti a prodotti o siero animale possono contenere anticorpi eterofili e provocare risultati atipici. Questo saggio è stato formulato in modo da ridurre il rischio di un'interferenza di questo genere. È tuttavia possibile che si manifestino potenziali interazioni tra sieri rari e i componenti de test.

13 VALORI PREVISTI

Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri valori di riferimento. I dati forniti servono esclusivamente come *indicazioni di massima*. I livelli di calcitonina sono stati misurati mediante il test calcitonina ELISA in cinquantanove (59) individui di sesso femminile e in cinquantadue (52) soggetti di sesso maschile in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti. I valori ottenuti nelle donne sono risultati compresi tra 0,1 e 10,9 pg/mL, mentre negli uomini l'intervallo è variato tra 0,2 e 27,7 pg/mL. Sulla base di test statistici di asimmetria e curtosi, la popolazione, una volta trasformata a livello logaritmico, segue la distribuzione normale o gaussiana.

Per le donne, la media geometrica e ± 2 deviazioni standard calcolate sono comprese tra 0,07 e 12,97 pg/mL, mentre negli uomini sono comprese tra 0,68 e 30,26 pg/mL.

Conformemente alla letteratura in materia^{2,9}, i livelli di calcitonina in genere sono risultati inferiori nelle donne rispetto agli uomini. Di conseguenza, i valori di riferimento sono inferiori a 13 e 30 pg/m rispettivamente per soggetti di sesso femminile e maschile.

14 CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

14.1 Accuratezza

Settantasei (76) campioni paziente, con valori di calcitonina compresi tra 0,8 e 3.113 pg/mL, sono stati analizzati mediante la procedura ELISA e il saggio immunoradiometrico della calcitonina (kit IRMA). L'analisi di regressione lineare fornisce i seguenti dati statistici:

$$\text{DRG ELISA} = 0.940 \text{ IRMA Kit} + 6,55 \text{ pg/mL } r = 0,993, N = 123$$

Inoltre, cinquantuno (51) campioni paziente, con valori di calcitonina compresi tra < 0,7 e 2.240 pg/mL, sono stati analizzati mediante la procedura ELISA e il dosaggio immunometrico in chemiluminescenza per il kit di calcitonina (kit IRMA) [dosaggio immunochemiluminometrico, ICMA]. L'analisi di regressione lineare fornisce i seguenti dati statistici:

$$\text{DRG ELISA} = 1.094 \text{ ICMA Kit} - 6,13 \text{ pg/mL } r = 0,995, N = 123$$

14.2 Sensibilità

La sensibilità, o limite di rilevabilità, di questo saggio è definita come singolo valore minimo distinguibile dallo zero a un limite di confidenza del 95%. Il test calcitonina ELISA DRG ha una sensibilità calcolata a 1,0 pg/mL.

14.3 Precisione e riproducibilità

La precisione (variazione intra-saggio) del test calcitonina ELISA DRG è stata calcolata da 20 determinazioni replicate su ciascuno dei tre campioni.

Variazione intra-saggio

Campione	Valore Medio (pg/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	24,3	20	5,7
B	94,9	20	4,3
C	403	20	2,8

La precisione totale (variazione inter-saggio) del test calcitonina ELISA DRG è stata calcolata dai dati di tre campioni ottenuti in 15 saggi diversi, da parte di tre tecnici su due partite diverse di reagenti, lungo un arco di tempo di tre settimane.

Variazione inter-saggio

Campione	Valore Medio (pg/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	16,5	15	7,4
B	64,5	15	7,4
C	340	15	6,1

14.4 Recupero

Per determinare il recupero, al siero di quattro pazienti diversi sono state aggiunte varie quantità di calcitonina. I risultati sono descritti nella tabella seguente:

Campione sierico	Endogeno Calcitonina (pg/mL)	Calcitonin aggiunto (pg/mL)	Valore previsto (pg/mL)	Valore misurato (pg/mL)	Recupero (%)
A	0	--	--	--	--
	0	100	100	110	110%
	0	200	200	217	109%
B	9.7	--	--	--	--
	8.7	100	109	106	97%
	7.8	200	208	207	100%
C	0	--	--	--	--
	0	100	100	104	104%
	0	200	200	205	103%
D	5.7	--	--	--	--
	5.1	126	131	119	91%
	4.6	220	225	203	90%

14.5 Specificità e reattività incrociata

Cross-reagente	Concentrazione di Cross-reagente	Calcitonina senza Cross-reagente (pg/mL)	Calcitonina con Cross-reagente (pg/mL)	Variazione di Calcitonina (pg/mL)	Reattività incrociata (%)
PTH	100,000 pg/mL	186	194	8	0.00800
	30,000 pg/mL	186	200	14	0.04667
	10,000 pg/mL	186	194	8	0.08000
Peptide correlato al gene per la calcitonina	1,000,000 pg/mL	200	202	2	0.00020
	100,000 pg/mL	200	204	4	0.00400
Calcitonina di salmone	1,000,000 pg/mL	191	194	3	0.00030
	100,000 pg/mL	191	199	8	0.00800
TSH	5000 µIU/mL	198	203	5	0.00061
	500 µIU/mL	198	198	0	0.00000
	50 µIU/mL	198	199	1	0.01220

Ogni cross-reagente viene combinato in un campione contenente calcitonina. Il livello di calcitonina è misurato prima e dopo l'aggiunta di analita. Nessun crossreagente interferisce con il test calcitonina ELISA. Le piccole variazioni di calcitonina misurate sono comprese tra i dati statistici di precisione intra-saggio.

14.6 Effetto cinetico dell'analisi

Al fine di determinare la presenza di un effetto cinetico sistematico tra l'inizio e la fine della seduta analitica, tre pool di campioni sierici con l'aggiunta di analita, selezionati come rappresentativi di una sezione della concentrazione di calcitonina, sono stati messi in sequenza in tutta la seduta di una micropiastra o di 96 pozzetti (con dodici strisce per 8 pozzetti). I risultati non indicano una deriva significativa dell'analisi.

14.7 Linearità delle diluizioni del campione paziente: parallelismo

I campioni sierici di sei pazienti sono stati diluiti con il calibratore A (calibratore zero). I risultati, espressi in pg/mL, sono indicati di seguito:

Campione	Diluzione	Previsto (E)	Osservato (O)	% osservato - previsto
A	Non diluito	-	343	-
	1:2	172	168	98%
	1:4	85.8	81.3	95%
	1:8	42.9	40.3	94%
B	Non diluito	-	271	-
	1:2	136	131	97%
	1:4	67.8	70	103%
	1:8	33.9	34.3	101%
C	Non diluito	-	265	-
	1:2	133	134	101%
	1:4	66	70.4	106%
	1:8	33.1	32.5	98%
D	Non diluito	-	>1000	-
	1:2	-	1060	-
	1:4	530	504	95%
	1:8	265	271	102%
E	Non diluito	-	231	-
	1:2	116	116	100%
	1:4	57.8	58.8	102%
	1:8	28.9	27.1	94%
	1:16	14.4	12.1	84%
F	Non diluito	-	>1000	-
	1:2	-	997	-
	1:4	499	429	86%
	1:8	249	223	89%
	1:16	125	119	95%

1 USO PREVISTO

El enzimoimmunoanálisis de calcitonina de DRG se utiliza para la determinación cuantitativa de calcitonina en el suero humano. Este análisis se destina a uso diagnóstico in vitro.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La calcitonina, un polipéptido de 32 amino ácidos, es secretada principalmente por las células C parafoliculares tiroideas. Su principal efecto biológico es inhibir la reabsorción de hueso osteoclástico. Esta propiedad ha hecho que se utilice la calcitonina en caso de trastornos caracterizados por una reabsorción aumentada, tales como la enfermedad de Paget, para algunos pacientes con osteoporosis.

3 TRASCENDENCIA CLÍNICA

El síndrome clínico más prominente asociado con un trastorno de hipersecreción de la calcitonina es el carcinoma medular de tiroides (MTC). El MTC es un tumor de las células C (productoras de calcitonina) de la glándula tiroides. Aunque el MTC es poco común (comprende entre el 5 y el 10% de todos los cánceres de tiroides), con frecuencia es fatal. Puede ocurrir esporádicamente o en una forma familiar que se transmite como un rasgo autosómico dominante. El MTC reviste una gran importancia clínica debido a su distribución familiar. Más aún, se presta a un diagnóstico temprano mediante la calcitonina en suero. Es posible curarlo totalmente cuando aún es una enfermedad subclínica temprana¹. Frecuentemente se lo asocia con otras características clínicas y tiene un buen potencial de cura con la cirugía. A pesar de ser un tumor poco común, pueda darse en un patrón familiar^{1,3,4} como una neoplasia endocrina múltiple tipo II. Estos tumores generalmente producen concentraciones elevadas de calcitonina en suero que sirven para su diagnóstico. Por lo tanto, el inmunoanálisis de calcitonina en suero puede utilizarse para diagnosticar la presencia de MTC con un grado excepcional de exactitud y especificidad. No obstante, en el pequeño porcentaje de pacientes (si bien en aumento), los niveles de la hormona basal no difieren de los niveles normales¹. Algunos de estas personas presentan las primeras etapas de neoplasia o hiperplasia de las células C durante las cuales la cura quirúrgica es muy factible. Para detectar tempranamente la enfermedad en estos pacientes es necesario realizar pruebas de provocación de secreción de calcitonina, para descartar la posibilidad de falsos resultados negativos si se realiza solamente la determinación de la calcitonina basal. La mayoría de los tumores responden con un nivel aumentado de calcitonina a la administración de calcio⁵ o pentagastrina⁶ o su combinación⁷, pero cualquiera de esos agentes puede, con todo, brindar resultados engañosos. Por lo tanto, en casos con manifestaciones clínicas, deben considerarse ambos agentes para pruebas de diagnóstico. Más aún, las mediciones de calcitonina también pueden ser utilizadas para supervisar la eficacia de la terapia en pacientes con tumores productores de calcitonina.

Se ha informado el hallazgo de varias formas de calcitonina inmunoreactiva en personas normales o pacientes con MTC. Estas diversas formas de calcitonina tienen pesos moleculares que van desde 3.400 (monomérico) hasta 70.000 Dalton (polimérico).

Los trastornos neoplásicos de otras células neuroendocrinas también pueden elevar la calcitonina. El mejor ejemplo es el cáncer de pulmón de células pequeñas. Otros tumores tales como los carcinoides y los tumores de células del islote del páncreas pueden también dar como resultado una calcitonina en suero elevada.

Los aumentos de calcitonina en suero también han sido observados tanto en falla renal crónica como aguda, hipercalcemia e hipercalcemia.

4 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El inmunoanálisis para la detección de calcitonina de DRG es un enzimoimmunoanálisis [ELISA] para la medición de la cadena de calcitonina biológicamente intacta de 32 aminoácidos. Utiliza dos anticuerpos monoclonales de ratón diferentes a la calcitonina humana, específicos para regiones bien definidas en la molécula de calcitonina. Un anticuerpo se enlaza sólo con la calcitonina 11-23 y este anticuerpo es biotinilado. El otro anticuerpo está preparado para enlazar sólo la calcitonina 21-32, estando marcado con peroxidasa de rábano [HRP] para detección.

Pocillo de estreptavidina--Anticalcitonina biotinilada (1 1-23)--Calcitonina intacta--Anticalcitonina conjugada con HRP (2 1-32)

En este análisis, los calibradores, los controles o las muestras de los pacientes se incuban simultáneamente con el anticuerpo marcado con enzimas y un anticuerpo acoplado con biotina en un pocillo de microplaca recubierto con estreptavidina. De este modo, la calcitonina en la muestra queda entre estos dos anticuerpos (en "sándwich"). Al final de la incubación del análisis, el micropocillo se lava para eliminar componentes sueltos y la enzima enlazada a la fase sólida se incuba con el sustrato, tetrametilbencidina (TMB). Se agrega luego una solución de parada ácida para interrumpir la reacción, cambiándose el color a amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de calcitonina en la muestra. Se genera una curva dosis-respuesta de la unidad de absorbencia frente a la concentración mediante la utilización de los resultados obtenidos de los calibradores. Las concentraciones de calcitonina presentes en los controles y las muestras de pacientes se determinan directamente a partir de esta curva.

5 COMPONENTES DEL KIT

Componentes del kit	Descripción	Cantidad
RGT 1 = Reactivo 1	Anticuerpo de calcitonina biotinilado	1 x 7,0 mL
RGT 2 = Reactivo 2	Anticuerpo de calcitonina marcado con peroxidasa (Enzima)	1 x 7,0 mL
RGT 3 = Reactivo 3	Solución de reconstitución con EDTA	1 x 10 mL
RGT A = Reactivo A	Concentrado de lavado para ELISA [Salino con agente tensioactivo]	1 x 30 mL
RGT B = Reactivo B	Sustrato TMB [tetrametilbencidina]	1 x 20 mL
SOLN = Solución de parada	Solución de parada para ELISA [ácido sulfúrico 1 N]	1 x 20 mL
PLA = Microplaca	Un soporte con tiras recubiertas de estreptavidina.	12 tiras de 8 pocillos
CAL = Calibradores A = 0 pg/mL B - F Consulte las etiquetas del vial para obtener las concentraciones exactas	Calcitonina sintética liofilizada Calibrador cero liofilizado [solución BSA]. Todos los demás calibradores constan de calcitonina (1-32) en solución BSA, calibrada según 2ª IS 89/620 de la OMS	1 x 2 mL para el calibrador cero 1 x 1 mL para todos los demás calibradores
CTRL = Controles 1 y 2 Consulte las etiquetas del vial para obtener los intervalos exactos	Liofilizados. 2 niveles. Calcitonina sintética (1-32) en solución BSA.	1 x 1 mL por nivel

5.1 MATERIAL Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Lector de microplacas capaz de medir la absorbencia en longitudes de onda de 450 nm y 405 nm.
- Lavadora de microplacas [si no se puede disponer de una lavadora, se podría aceptar el lavado manual].
- Pipetas de precisión para dosificar 50, 100 y 150 µL.
- (*Opcional*): Un dosificador de canales múltiples o un dosificador de repetición para 50, 100 y 150 µL.
- Agitadores de microplaca: DRG ha descubierto que para los diámetros de agitador indicados a continuación, los kits de estreptavidina mantendrán una respuesta de rendimiento óptima en las siguientes configuraciones de velocidad:

Agitadores de microplaca	Diámetro de agitador	Configuración de velocidad:
Orbitario	3 mm (0,118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 rpm
Lineal	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 rpm

6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

Si bien el diseño específico de los reactivos suministrados en este kit garantiza la ausencia de componentes de la sangre humana, las muestras de pacientes, que pueden presentar anticuerpos de HBsAg, HBcAg o VIH, deben considerarse un riesgo biológico potencial. Deben tomarse las precauciones habituales en la manipulación de dichas muestras, como se hace con las muestras de pacientes no analizadas.

La solución de parada consiste en ácido sulfúrico 1 N. Se trata de un ácido potente. Si bien el mismo se encuentra diluido, debe manipularse con cuidado. Puede producir quemaduras y debe manipularse con guantes, gafas y ropa protectora adecuada. Cualquier derrame debe enjuagarse inmediatamente con abundante cantidad de agua. No respire cuando advierta el vapor del mismo y evite su inhalación.

Si se observa turbidez en algún reactivo, no realice el ensayo y póngase en contacto con su distribuidor.

Se encuentran a la venta diversos tipos de agitador con diferentes especificaciones. En caso de que el agitador de microplaca no se encuentre dentro del intervalo especificado anteriormente, se anima a cada laboratorio a establecer su propio intervalo óptimo.

7 RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

La determinación de calcitonina debe realizarse con suero. Para realizar un análisis de la muestra por duplicado, se requiere 200 µL de suero. Recolecte sangre completa sin anticoagulante. Luego de permitir que la sangre se coagule, debe separarse inmediatamente el suero, preferentemente en una centrífuga refrigerada y almacenarse a -20 °C como mínimo. Evite las muestras marcadamente lipémicas o hemolizadas.

8 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Almacene todos los componentes del kit a 2 °C - 8 °C.

1. Todos los reactivos, excepto los calibradores, los controles de kit y el concentrado de lavado, están listos para usar. Almacene todos los reactivos a 2 °C - 8 °C.
2. Reconstituya el calibrador A (estándar cero) con 2.0 mL de agua destilada o desionizada y mezcle. En cada uno de los calibradores que no sean cero (del Calibrador B al F) y en los controles 1 y 2 del kit, reconstituya cada vial con 1,0 mL de Reactivo 3 (Solución de reconstitución) y mezcle. Permita que los viales reposen 10 minutos y luego mezcle por completo, invirtiendo el envase con cuidado para obtener la reconstitución completa. **Utilice los calibradores y los controles lo antes posible luego de la reconstitución. Congele (a -20 °C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos en un congelador que no sea autodescongelante.** Las normas y los controles permanecen estables a -20 °C durante 6 semanas luego de la reconstitución, con un máximo de 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento al manipularse según lo recomendado en la sección "Notas de procedimiento".
3. **ELISA Reactivo A:** Concentrado de lavado: Mezcle el contenido del concentrado de lavado por completo. Si el concentrado de lavado presenta signos de precipitación debido al almacenamiento a una temperatura menor, como podría ser 4 °C, disuélvalo colocando el vial a baño María o en el horno a 37 °C y revuélvalo. Agregue el concentrado de lavado (30 mL) a 570 mL de agua destilada o desionizada y mezcle. La solución de lavado diluida permanece estable por 90 días cuando la misma se almacena a temperatura ambiente.

9 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

1. Coloque una cantidad suficiente de **Tiras recubiertas de estreptavidina** en un soporte para ejecutar la totalidad de los seis (6) calibradores, del Calibrador A al F de los CALIBRADORES de calcitonina [la concentración exacta se indica en la etiqueta del vial], el suero de control de calidad y las muestras de pacientes. Como mínimo designe dos pocillos para que sirvan como "pocillos de blanco". Referirse al paso 10 para la lectura final de placa.
2. Coloque **100 µL** de los calibradores, los controles y las muestras en una pipeta y viértala en el pocillo designado o asignado. **Congele (a -20 °C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos.**
3. Agregue o vierta **50 µL** del Reactivo 1 (Anticuerpo biotilado) en cada uno de los pocillos que ya contengan los calibradores, los controles y las muestras.
4. Agregue o vierta **50 µL** del Reactivo 2 (Anticuerpo marcado con enzimas) en los mismos pocillos.
5. Cubra la o las microplacas con una bandeja o una película de aluminio para evitar la exposición a la luz y colóquelas en un **agitador** preparado a la configuración recomendada (consulte la sección 5.1) durante **4 horas ± 30 minutos** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
6. Primero, aspire el fluido completamente y luego lave/aspire cada pocillo cinco (5) veces con la solución de lavado activa (preparada a partir del Reactivo A), utilizando una lavadora de microplacas automática. El volumen de solución de lavado debe prepararse para verter 0,35 mL en cada pocillo.
7. Agregue o vierta **150 µL** de la prueba **ELISA Reactivo B** (sustrato TMB) en cada uno de los pocillos, excepto en los pocillos de blanco.
8. Con una cubierta adecuada para evitar la exposición a la luz, coloque la o las microplacas en un **agitador** preparado a la configuración recomendada (consulte la sección 5.1) durante **30 ± 5 minutos** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
9. Agregue o vierta **100 µL** de la solución de parada en cada uno de los pocillos, excepto en los pocillos de blanco. Mezcle suavemente.
10. Antes de la lectura, asegúrese de que los dos pocillos de blanco mencionados en el paso 1 se hayan llenado con 250 µL de agua destilada o desionizada. Utilice los pocillos de blanco para hacer el blanco del lector de placas, de conformidad con las instrucciones del fabricante.*
Determine la absorbancia de la solución en los pocillos en los 10 minutos siguientes; para ello, use un lector de microplacas a **450 nm**. **Lea la placa otra vez** con el lector a **405 nm**, también con agua destilada o desionizada.

**Si, por motivos técnicos, no es posible ajustar el lector de placas ELISA a cero usando el blanco, sustraiga el valor de absorbancia del blanco a todos los demás valores de absorbancia para obtener resultados.*

Nota: La segunda lectura está destinada a extender la validez analítica de la curva de calibración hasta el valor representado por el calibrador más alto, que es aproximadamente 1000 pg/mL. Por lo tanto, las muestras de pacientes con calcitonina > 300 pg/mL pueden cuantificarse contra una curva de calibración que consista en las lecturas ascendentes hasta la concentración equivalente al calibrador más alto, utilizando la lectura de 405 nm, lejos de la longitud de onda de absorbencia máxima. En general, las muestras de pacientes y controles deben leerse utilizando los 450 nm para concentraciones de calcitonina de hasta 300 pg/mL. Las concentraciones de calcitonina superiores a 300 pg/mL deben interpolarse mediante la lectura de 405 nm.

11. Con los valores de absorbancia finales obtenidos en el paso anterior, trace una curva de calibración mediante una interpolación punto a punto o una interpolación logística de 4 parámetros o de regla flexible cúbica para cuantificar la concentración de la calcitonina.

9.1 NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- La calcitonina 1-32 es una molécula muy lábil. Prepare el análisis inmediatamente al realizarse la reconstitución o el descongelamiento de todos los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
- Se recomienda realizar los análisis de todos los calibradores, los controles y las muestras de pacientes por duplicado. Las unidades de absorbancia promedio de grupos duplicados deben utilizarse entonces para reducir datos y calcular resultados.
- Las muestras deben colocarse en pipetas y verterse en el pocillo con una mínima cantidad de burbujas de aire. Para lograrlo, se recomienda utilizar la técnica de "pipeta inversa" descrita en el folleto de los fabricantes de pipetas incluido en el paquete.
- Las muestras de pacientes con valores superiores al calibrador más alto (Calibrador F), aproximadamente 1.000 pg/mL (vea la concentración exacta en la etiqueta del vial), pueden diluirse con el Calibrador A (Calibrador cero) y volver a analizarse. Multiplique el resultado por el factor de dilución.
- Los reactivos de números de lote diferentes no deben intercambiarse.

- Si lo prefiere, mezcle el Reactivo 1 (Anticuerpo biotinilado) y el Reactivo 2 (Anticuerpo marcado con enzimas) en una botella ámbar limpia empleando a tal fin volúmenes iguales y cantidades suficientes para el análisis. El reactivo combinado se mantiene estable por siete (7) días si se almacena a 4 °C. Luego, vierta 100 µL del anticuerpo mezclado en cada pocillo. Este método alternativo debe reemplazar al Paso (3) y (4), seguido por la incubación con agitador orbitario.
- Al mezclar, evite salpicar los reactivos fuera de los pocillos. Esto afectará la precisión y la exactitud del análisis.

10 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

10.1 Método manual

1. Para las lecturas de 450 nm, construya un curva dosis-respuesta (curva de calibración) utilizando los primeros cinco calibradores suministrados, es decir, los Calibradores A, B, C, D y E. Para las lecturas de 405 nm, trace una segunda curva dosis-respuesta utilizando los tres calibradores con las concentraciones más altas, es decir, los Calibradores D, E y F.
2. Asigne la concentración para cada calibrador indicada en el vial en pg/mL. Trace los datos de la curva de calibración en papel milimetrado para gráficos con la concentración en el eje X y la unidad de absorbencia en el eje Y.
3. Dibuje una línea recta entre 2 puntos adyacentes. Este algoritmo matemático se conoce comúnmente como el cálculo "punto a punto". Obtenga la concentración de la muestra ubicando la unidad de absorbencia en el eje Y y buscando el valor de concentración correspondiente en el eje X. Las muestras de pacientes y controles deben leerse utilizando los 450 nm para concentraciones de calcitonina hasta los 300 pg/mL. Las concentraciones de calcitonina superiores a 300 pg/mL deben interpolarse mediante la lectura de 405 nm.

10.2 Método automático

Los programas informáticos que utilizan la regla flexible cúbica o 4 PL [Logística de 4 parámetros] o punto a punto pueden resultar adecuados.

Datos de muestra a 450 nm [lectura de unidad de absorbencia bruta contra a⁹ua destilada o desionizada]

Pocillo de microplaca	Unidad de absorbencia de 1ª lectura	Unidad de absorbencia de 2ª lectura	Unidad de absorbencia promedio	Calcitonina en pg/mL	Calcitonina en pg/mL Resultado a informar
Calibrador A	0,008	0,009	0,0085		0
Calibrador B	0,059	0,064	0,0615		10
Calibrador C	0,186	0,194	0,190		30
Calibrador D	0,578	0,602	0,590		100
Calibrador E	1,900	1,882	1,891		300
Control 1	0,127	0,122	0,125	20,6	20,6
Control 2	2,554	2,565	2,560	> 300	*
Muestra de paciente 1	0,034	0,040	0,037	4,7	4,7
Muestra de paciente 2	0,104	0,098	0,101	16,3	16,3
Muestra de paciente 3	0,397	0,411	0,404	68,7	68,7
Muestra de paciente 4	2,195	2,173	2,184	> 300	*

- Debido a que la lectura de la concentración es > 300 pg/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en 405 nm, como se muestra en los **Datos de muestra a 405 nm** en la tabla incluida a continuación.

Datos de muestra a 405 nm [lectura de unidad de absorbencia bruta contra agua destilada o desionizada]

Pocillo de microplaca	Unidad de absorbencia de 1ª lectura	Unidad de absorbencia de 2ª lectura	Unidad de absorbencia promedio	Calcitonina en pg/mL	Calcitonina en pg/mL Resultado a informar
Calibrador A	0,005	0,005	0,005		0
Calibrador D	0,187	0,198	0,193		100
Calibrador E	0,602	0,597	0,599		300
Calibrador F	1,898	1,910	1,904		1000
Control 1	0,045	0,044	0,045	< 300	¶
Control 2	0,814	0,816	,815	403	403
Muestra de paciente 1	0,016	0,020	0,018	< 300	¶
Muestra de paciente 2	0,039	0,035	0,037	< 300	¶
Muestra de paciente 3	0,128	0,134	0,131	< 300	¶
Muestra de paciente 4	0,697	0,689	0,693	345	345

¶ Para las muestras con una lectura < 300 pg/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en 450 nm, como se muestra en los **Datos de muestra a 450 nm** en la tabla incluida arriba. Esta práctica debe producir los resultados con óptima sensibilidad del análisis.

NOTA: Los datos presentados sólo tienen fines de ilustración y no deben utilizarse en lugar de los datos generados durante el análisis.

11 CONTROL DE CALIDAD

El suero de control o los grupos de sueros deben analizarse con cada ejecución de los calibradores y las muestras de pacientes. Los resultados generados a partir del análisis de las muestras de control deben evaluarse para su aceptación utilizando los métodos estadísticos adecuados. Es posible que, en análisis con uno o más valores de muestra de control de calidad que se encuentren fuera de los límites aceptables, los resultados de la muestra del paciente no sean válidos.

12 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El kit ELISA para calcitonina de DRG no ha exhibido ningún "efecto gancho de alta dosis" en muestras que contenían 1.000.000 pg/mL de calcitonina (1-32) intacta pura. La muestra dio un resultado superior al estándar más elevado, es decir, 1.000 pg/mL. Sin embargo, las muestras con niveles de calcitonina mayores que el calibrador más alto deben diluirse y volver a analizarse para obtener los valores correctos.

A semejanza de lo que sucede con cualquier analito utilizado como adjunto de diagnóstico, los resultados de la calcitonina deben interpretarse cuidadosamente con las presentaciones clínicas generales y otras pruebas de diagnóstico complementarias.

Los suplementos que contienen niveles altos de biotina, como los que se comercializan para el cuidado del pelo, la piel y las uñas, pueden contener cantidades interferentes de biotina. Unos niveles más altos de biotina que la dosis diaria recomendada pueden causar interferencias con el ensayo. Por lo tanto, es importante comunicarse con los profesionales sanitarios y con los pacientes sobre la dosis de biotina al recoger las muestras para evitar resultados de pruebas incorrectos. Los resultados muestran que 2 ng/mL de D-Biotina es la máxima concentración en la que no se ha observado ninguna interferencia significativa.

Las muestras de pacientes habitualmente expuestos a animales o a productos de suero animal pueden contener anticuerpos hererófilos que produzcan resultados atípicos. Este ensayo se ha formulado para mitigar el riesgo de este tipo de interferencia. Sin embargo, pueden producirse posibles interacciones entre sueros poco comunes y los componentes de la pueba.

13 VALORES PREVISTOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia. Los datos suministrados deben utilizarse sólo como *guía*. Los niveles de calcitonina se midieron en cincuenta y nueve (59) personas de sexo femenino aparentemente normales y en cincuenta y dos (52) personas de sexo masculino aparentemente normales con el enzimoimmunoanálisis (ELISA) de calcitonina de DRG. Los valores obtenidos en las mujeres normales oscilaban entre 0,1 y 10,9 pg/mL y los valores obtenidos en los varones normales oscilaban entre 0,2 y 27,7 pg/mL. Según las pruebas estadísticas sobre asimetría y curtosis, la población sigue la distribución gaussiana o normal.

Las desviaciones estándar de la media geométrica de + 2 para las mujeres normales se calcularon entre 0,07 y 12,97 pg/mL, y entre 0,68 y 30,26 pg/mL para los varones normales. De manera consistente con las publicaciones ^{2,9}, los niveles de calcitonina generalmente fueron inferiores en las mujeres normales que en los varones normales. Por lo tanto, el rango de referencia debe ser inferior a 13 y 30 pg/mL para mujeres y hombres, respectivamente.

14 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

14.1 Precisión

Setenta y siete muestras de pacientes, con valores de calcitonina de entre 0,8 y 3,113 pg/mL fueron analizadas por el procedimiento de enzimoimmunoanálisis (ELISA) de DRG y un análisis inmunoradiométrico de calcitonina (Kit IRMA). El análisis de regresión lineal brinda las siguientes estadísticas:

$$\text{Prueba ELISA de DRG} = \text{Kit IRMA de } 0,940 + 6,55 \text{ pg/mL}; \quad r = 0,993, \quad N = 123$$

Más aún, setenta y una muestras de pacientes, con valores de calcitonina que oscilaban entre 0,7 y 2,240 pg/mL fueron analizadas por el procedimiento de enzimoimmunoanálisis (ELISA) de DRG y un kit de inmunoanálisis quimioluminiscente para calcitonina (ICMA). El análisis de regresión lineal brinda las siguientes estadísticas:

$$\text{Prueba ELISA de DRG} = \text{Kit ICMA de } 1,094 - 6,13 \text{ pg/mL}; \quad r = 0,995, \quad N = 123$$

14.2 Sensibilidad

La sensibilidad o el límite de detección mínimo de este análisis se define como el valor individual menor, que puede distinguirse de cero en el límite de confianza de 95%. El enzimoimmunoanálisis (ELISA) de calcitonina de DRG tiene una sensibilidad calculada de 1,0 pg/mL.

14.3 Precisión y reproducibilidad

La precisión (variación intraanálisis) de la prueba ELISA para calcitonina de DRG se calculó a partir de 20 determinaciones repetidas en cada una de las tres muestras.

Variación intra análisis			
Muestra	Valor Medio (pg/mL)	N	Coefficient de variación %
A	24,3	20	5,7
B	94,9	20	4,3
C	403	20	2,8

La precisión total (variación interanálisis) de la Prueba ELISA para calcitonina de DRG se calculó a partir de los datos de tres muestras obtenidas por tres técnicos en 15 análisis diferentes en dos lotes de reactivos diferentes, durante un período de tres semanas.

Variación inter análisis			
Muestra	Valor Medio(pg/mL)	N	Coefficient de variación %
A	16,5	15	7,4
B	64,5	15	7,4
C	340	15	6,1

14.4 Recuperación

Se agregaron diversas cantidades de calcitonina a cuatro sueros de pacientes diferentes para determinar la recuperación. Los resultados se describen en la siguiente tabla:

Muestra de suero	Calcitonina Endógena (pg/mL)	Calcitonina Añadida (pg/mL)	Valor previsto (pg/mL)	Valor medido (pg/mL)	Recuperación (%)
A	0	--	--	--	--
	0	100	100	110	110 %
	0	200	200	217	109 %
B	9,7	--	--	--	--
	8,7	100	109	106	97 %
	7,8	200	208	207	100 %
C	0	--	--	--	--
	0	100	100	104	104 %
	0	200	200	205	103 %
D	5,7	--	--	--	--
	5,1	126	131	119	91 %
	4,6	220	225	203	90 %

14.5 Especificidad y reactividad cruzada

Reactante cruzado	Concentración de reactante cruzado	Calcitonina sin reactante cruzado [pg/mL]	Calcitonina con reactante cruzado [pg/mL]	Cambio en calcitonina [pg/mL]	% de reactividad cruzada
PTH(1-84)	100,000 pg/mL	186	194	8	0,00800%
	30,000 pg/mL	186	200	14	0,04667%
	10,000 pg/mL	186	194	8	0,08000%
Péptido relacionado con gen de calcitonina	1,000,000 pg/mL	200	202	2	0,00020%
	100,000 pg/mL	200	204	4	0,00400%
Calcitonina de salmón	1,000,000 pg/mL	191	194	3	0,00030%
	100,000 pg/mL	191	199	8	0,00800%
TSH (tirotropina)	5000 uIU/mL	198	203	5	0,00061%
	500 uIU/mL	198	193	0	0,00000%
	50 uIU/mL	198	199	1	0,01220%

Cada reactante cruzado se coloca en una muestra que contiene calcitonina. El nivel de calcitonina se mide antes y después del añadido del reactante cruzado. Ninguno de los reactantes cruzados interfiere con esta prueba ELISA de calcitonina. Los pequeños cambios medidos en la calcitonina se encuentran completamente dentro de las estadísticas de precisión del intraanálisis.

14.6 Efecto cinético del análisis

Para determinar si existe algún efecto cinético sistemático entre el comienzo de la ejecución y su finalización, se colocaron en secuencia tres grupos de sueros de pacientes, seleccionados para brindar una muestra representativa adecuada, a lo largo de toda la ejecución de una microplaca o 96 pocillos [con doce tiras de 8 pocillos]. Los resultados no muestran una variación significativa del análisis.

14.7 Linealidad de diluciones en muestras de pacientes: Paralelismo

Se diluyeron seis muestras de suero de pacientes con Calibrador A (Calibrador cero). A continuación, se muestran los resultados en pg/mL:

Muestra	Dilución	Valor previsto	Valor observado	% Observado ÷ previsto
A	Sin diluir	-	343	-
	1:2	172	168	98 %
	1:4	85,8	81,3	95 %
	1:8	42,9	40,3	94 %
B	Sin diluir	-	271	-
	1:2	136	131	97 %
	1:4	67,8	70	103 %
	1:8	33,9	34,3	101 %
C	Sin diluir	-	265	-
	1:2	133	134	101 %
	1:4	66	70,4	106 %
	1:8	33,1	32,5	98 %
D	Sin diluir	-	>1000	-
	1:2	-	1060	-
	1:4	530	504	95%
	1:8	265	271	102%
E	Sin diluir	-	231	-
	1:2	116	116	100%
	1:4	57,8	58,8	102%
	1:8	28,9	27,1	94%
	1:16	14,4	12,1	84%
F	Sin diluir	-	>1000	-
	1:2	-	997	-
	1:4	499	429	86 %
	1:8	249	223	89 %
	1:16	125	119	95 %

15 REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

1. Deftos, L.J., **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**, (edited by Favus, N.J.), 1st Edition, American Society for Bone and Mineral Research, pp 53-55, 1990.
2. Deftos, L.J., Weisman M.H., Williams G.H., Karpf, D.B., Frumar, A.M., Davidson, B.H., Parthemore, J.G., Judd, H.L., Influence of age and sex on plasma calcitonin in human beings. **N. Engl. J. Med.** 302:1351-1353, 1980.
3. Travis, J.C., (ed) Clinical Radioimmunoassay . . . State-of-the-Art, **Scientific News Letters, Inc.** Radioassay - Legend Assay Publishers, Anaheim, CA 92803, 1980, 1st Edition.
4. Austin, L.A., and Heath, H., III, Medical Progress, Calcitonin Physiology and Pathophysiology, **N. Engl. J. Med.** 304:269,1981.
5. Pathemore, J.G., Bronzert, G.R., and Deftos, L.J., A short calcium infusion in the diagnosis of medullary thyroid carcinoma, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 39:108,1974.
6. Hennessy, J.F., Wells, S.A., Ontjes, D.A., and Cooper, C.W., 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, 1974.
7. Wells, S.A., Baylin, S.B., Linehan, W.M. et al, Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. **Ann. Surg.** 188:139, 1978.
8. Body J.J. and Heath III, H. Estimates of circulating monomeric calcitonin: physiological studies in normal and thyroidectomized man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 57:897, 1983
9. Tiegs R.D., Body J.J., Barta J.M., and Heath III, H. Secretion and metabolism of monomeric human calcitonin: effects of age, sex and thyroid damage. **J. Bone Min. Res.** 1:339,1986.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité