

**Инструкция
пользователя**



Кальцитонин ИФА

REF EIA-3648

Σ 96 лунок

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 ОПИСАНИЕ

Используется для количественного определения Кальцитонина в сыворотке человека. Для диагностики in vitro.

2 НАИМЕНОВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

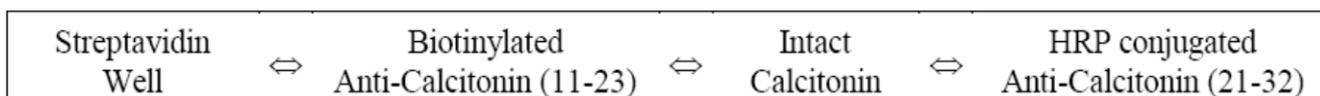
Кальцитонин, 32-аминокислотный полипептид секретируется, в основном, парафолликулярными С – клетками щитовидной железы. Кальцитонин ингибирует остеокластную ресорпцию кости. Это свойство привело к использованию кальцитонина при расстройствах, характеризующихся повышенной ресорбцией, таких как болезнь Паджета, при остеопорозе у некоторых пациентов.

3 КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Медуллярный рак щитовидной железы (МРЩЖ) - известный клинический синдром, связанный с неупорядоченной гиперсекрецией кальцитонина. Он представляет собой опухоль щитовидной железы, развивающаяся из фолликулярных или С-клеток. Хотя медуллярный рак щитовидной железы – редкое заболевание, 5 - 10% от всех случаев со смертельным исходом. Он может возникать эпизодически у человека или передаваться по наследству как аутосомно-доминантное заболевание. Медуллярный рак щитовидной железы имеет большое клиническое значение из-за его наследуемости. Возможно, на ранней стадии диагностировать заболевание, измерив кальцитонин в сыворотке, и назначить лечение. Медуллярный рак щитовидной железы часто связан с другими клиническими признаками и имеет хороший потенциал для лечения с помощью хирургического вмешательства.

4 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

ДРГ Кальцитонин ИФА - набор для двухстадийного твердофазного иммуноферментного анализа для определения биологически интактной 32-аминокислотной цепочки Кальцитонина. Он использует два различных вида мышиного антитела к кальцитонину человека, специфичных к хорошо определяемым участкам молекулы кальцитонина. Одно антитело связывается только с кальцитонином 11-23, это антитело биотинировано. Второе антитело связывается только с кальцитонином 21-32, это антитело имеет метку пероксидазы хрена.



В ходе анализа калибраторы, контроли и образцы пациентов одновременно инкубируются с антителом с ферментной меткой и биотинированным антителом в микротитровальных лунках, покрытых стрептавидином. Таким образом, кальцитонин образцов образует связь по принципу «сэндвича» с двумя антителами. После инкубации лунки промываются для удаления несвязанных компонентов и фермент, связанный с твердой фазой инкубируется с субстратом тетраметилбензидина (ТМБ). Затем добавляется стоп раствор (кислота) для прекращения реакции и содержимое лунок приобретает желтую окраску. Интенсивность желтого окрашивания прямо пропорциональна концентрации кальцитонина в образце. Строится кривая зависимости концентрации от единиц абсорбции по результатам, полученным при измерении калибраторов. Концентрации кальцитонина контролей и образцов пациентов определяются по этой кривой.

5 КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Компоненты	Описание	кол-во
RGT 1 = реагент 1	биотинилированное антитело к кальцитонину	1 x 7 мл
RTG 2 = реагент 2	антитело к кальцитонину с ферментной меткой (пероксидаза хрена)	1 x 7 мл
RGT 3 = реагент 3	восстановительный раствор с ЭДТА	1 x 10 мл
RGT A = реагент А	промывочный концентрат (солевой р-р с ПАВ)	1 x 30 мл
RGT B = реагент В	субстрат ТМБ	1 x 20 мл
SOLN = стоп-раствор	Стоп-раствор (1 N серная кислота)	1 x 20 мл
Микротитровальный планшет	один держатель со стрипами, покрытыми стрептавидином	12 стрипов по 8 лунок
CAL = Калибраторы А (0 пг/мл) В-Ф: точная концентрация указана на флаконе.	лиофилизированный, синтетический h-кальцитонин. Лиофилизированный Нулевой калибратор (раствор BSA). Остальные калибраторы состоят из синтетического h-кальцитонина (1-32) раствор BSA, калиброванный по WHO 2-й IS 89/620	1 x 2 мл (нулевой) 1 x 1мл – остальные калибраторы
CTRL = Контроли 1& 2 (точные концентрации указаны на этикетке флакона)	лиофилизированы. 2 уровня. синтетический h-кальцитонин (1-32) в растворе BSA.	1x1 мл на уровень

5.1 Оборудование и материалы, не поставляемые в наборе.

- микропланшетный ридер для измерения абсорбции при длине волны 450 нм и 405 нм.
- автомат для промывки плашек [если нет в наличии, возможна промывка вручную].
- прецизионные пипетки на 50, 100 и 150 мкл.
- (опционно): многоканальная пипетка на 50, 100 и 150 мкл.
- микротитровальный шейкер:

Ниже указаны режимы шейкеров для оптимальной производительности:

Микротитровальный шейкер	Диаметр зоны шейкирования	Скорость
Орбитальный	3 мм	600 ± 10 об/мин
	19 мм	170 ± 10 об/мин
Линейный	2,5 мм	170 ± 10 об/мин

6 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно, сравните английскую инструкцию с русской, отдавая предпочтение английской и обращая особое внимание на состав набора и процедуру анализа. Убедитесь, что вам все понятно.

Реагенты набора не содержат компонентов человеческой крови. С образцами пациентов, которые могут иметь положительную реакцию на поверхностный антиген гепатита В, HBsAg или антитела к ВИЧ, необходимо обращаться как с потенциально биологически опасными. Необходимо соблюдать обычные меры предосторожности при работе с нетестированными образцами.

Стоп-раствор состоит из 1N серной кислоты. Это сильная кислота. Обращаться с осторожностью во избежание ожогов (использовать перчатки и защиту для глаз). В случае разливания немедленно смыть большим количеством воды. Не вдыхать испарения!

Коммерчески доступны разные виды шейкеров с различными спецификациями. В случае, если микропланшетный шейкер не попадает в указанный диапазон выше, каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный оптимальный диапазон.

7 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ПАЦИЕНТА

Определение кальцитонина должно выполняться на сыворотке. Чтобы исследовать образцы в дублях потребуется 200 мкл сыворотки. Заберите цельную кровь без антикоагулянта. Дайте крови свернуться, затем отделите сыворотку, предпочтительно в охлаждаемой центрифуге, и хранить при -20°C или ниже. Избегать сильно гемолизированных, липемических и желтушных образцов.

8 ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Хранить все компоненты набора при $2-8^{\circ}\text{C}$.

1. Все реагенты кроме калибраторов, контролей и промывочного концентрата готовы к использованию. Хранить все реагенты при $2-8^{\circ}\text{C}$, кроме промывочного концентрата, который необходимо хранить при комнатной температуре до разведения во избежание выпадения осадка.

2. Восстановите Калибратор А (Нулевой стандарт) в 2 мл. дистиллированной или деионизированной воды и перемешайте.

Для каждого из ненулевых калибраторов (от В до F) и контролей 1 и 2:

восстановить содержимое каждого флакона в 1 мл реагента 3 (восстановительный раствор) и смешать. Дать постоять 10 минут и тщательно смешать до полного восстановления. **Калибраторы и контроли необходимо использовать как можно скорее после восстановления. Заморозьте (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли как можно быстрее после использования в морозильнике (без автооттаивания).**

Стандарты и контроли стабильны 6 недель при -20°C после восстановления, выдерживают до трех размораживаний при условии обращения согласно рекомендаций пункта «Замечания по проведению анализа»

3. **Реагент А (Промывочный концентрат):** хорошо смешать содержимое. Если есть осадок вследствие хранения при низкой температуре (напр. 4°C), растворить осадок, поместив флакон на водяную баню 37°C . Добавить промывочный концентрат (30 мл) к 570 мл дистиллированной или деионизированной воды и перемешать. Разведенный рабочий промывочный раствор стабилен 90 дней при комнатной температуре.

9 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместить необходимое количество стрипов со стрептавидином в держатель, чтобы запустить все калибраторы (6), А – F Калибраторы кальцитонина, контроли качества сыворотки и образцы пациентов. Как минимум, 2 лунки определите как «бланки». Это нужно для финального чтения планшета в подпункте 10)
2. Внести 100 мкл калибраторов (6, А-F), контрольных сывороток и образцов пациентов в соответствующие лунки. **Заморозить (-20°C) оставшиеся калибраторы и контроли сразу после использования, (в холодильнике без авторазморозки).**
3. Внести 50 мкл реагента 1 (Биотинилированное антитело) в каждую лунку с калибратором/контролем или образцом.
4. Внести 50 мкл реагента 2 (антитела с ферментной меткой) в те же лунки.
5. Накрыть планшету алюминиевой фольгой или поддоном, чтобы предотвратить попадание света, затем поместить в шейкер (см. 5.1) на **4 часа \pm 30 минут при комнатной температуре ($22-28^{\circ}\text{C}$).**
6. Удалить все жидкое содержимое и промыть каждую лунку 5 раз рабочим промывочным раствором (приготовленным из Реагента 5), с использованием автоматического вошера. Объем промывочного раствора должен составлять 0,35 мл на каждую лунку.
7. Добавить 150 мкл реагента В (ТМВ субстрата) в каждую лунку.
8. С защитой от света, поместить планшеты в орбитальный шейкер (см. 5.1) на **30 ± 5 минут** при комнатной температуре ($22-28^{\circ}\text{C}$).
9. Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку, аккуратно перемешать.
10. Считать абсорбцию раствора в лунках в течение 10 минут, при длине волны 450 нм. Перед считыванием, убедитесь, что обе «лунки-бланки», указываемые в подпункте 1 наполнены 250 мкл дистиллированной или деионизированной воды. **Считать планшет снова при длине волны 405 нм против дистиллированной или деионизированной воды.**

Примечание: второе считывание проводится для того, чтобы увеличить аналитическую валидность калибровочной кривой до значения максимального калибратора (приблизительно 1,000 пг/мл). Следовательно, образцы пациентов с содержанием кальцитонина > 300 пг/мл могут определяться по калибровочной кривой, состоящей из считываний вплоть до концентраций, эквивалентных максимальному калибратору при длине волны 405 нм значительно отличающихся от длины волны максимальной абсорбции. То есть, контроли и образцы пациентов должны считываться при длине волны 450 нм для концентраций кальцитонина до 300 пг/мл. Концентрации кальцитонина более 300 пг/мл должны интерполироваться по результатам считываний при длине волны 405 нм.

11. Используя окончательные значения абсорбции, полученные на предыдущем этапе, построить калибровочную кривую по методу кубического сплайна, 4 параметровой логистики, или поточечной интерполяцией для определения концентрации кальцитонина.

9.1 Замечания по проведению анализа

- Молекула кальцитонина 1-32 – очень нестабильна. Анализ необходимо проводить сразу после восстановления или разморозки всех калибраторов, контролей и образцов пациента.
- Рекомендуется, чтобы все калибраторы, контроли, образцы пациентов исследовались в дубликate. Средние значения абсорбций должны использоваться для редактирования данных и подсчета результатов.
- Образцы должны вноситься в лунки с попаданием минимального количества воздуха. Для этого рекомендуется использовать “реверсионную пипетку”.
- Образцы пациента со значениями больше значения максимального калибратора (калибратор F - около 1,000 пг/мл (точная концентрация указана на этикетке флакона)), могут быть разведены калибратором А (нулевым) и исследованы повторно. Результат необходимо умножить на фактор разведения.
- Нельзя использовать реагенты из разных лотов.
- Если необходимо, в равных количествах смешайте реагент 1 (биотинированное антитело) и реагент 2 (антитело с ферментной меткой) в чистой стеклянной бутылке. Комбинированный реагент стабилен 7 дней при 4 °С. Раскапать 100 мкл смешанных антител в каждую лунку. Этот альтернативный метод заменяет этап (3) и (4), затем следует инкубация в орбитальном шейкере.
- При перемешивании избегать выплескивания реагентов из лунок. Это может сказаться на точности и прецизионности анализа.

10 ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Ручной метод

1. Для считываний при 450 нм, построить калибровочную кривую, используя первые пять калибраторов, т.е. калибраторы А, В, С, D и E. Для считываний при 405 нм, построить вторую кривую используя три калибратора с максимальными концентрациями, т.е. Калибраторы D, E и F.

2. Установить концентрацию для каждого калибратора, указанную на флаконе в пг/мл. Отложить данные калибровочной кривой на миллиметровой бумаге с концентрацией по оси X и соответствующей абсорбцией на оси Y.

3. Между двумя соседними точками провести прямую. Этот математический алгоритм известен как поточечный расчет. Получить концентрацию, отложив значение абсорбции по оси Y и найдя соответствующую концентрацию на оси X. Образцы пациентов и контроли необходимо считывать при 450 нм для концентраций кальцитонина до 300 пг/мл. Концентрации кальцитонина более 300 пг/мл должны интерполироваться используя значения считываний при 405 нм.

10.2 Автоматический метод:

Компьютерная программа, используя кубический сплайн или 4 PL(4-х параметровая логистика) или поточечный метод обычно дает хорошие результаты.

Пример данных при 450 нм.

лунка	1 считывание ОП	2 считывание ОП	Среднее ОП	Кальцитонин пг/мл	Кальцитотнин пг/мл – результаты для отчета
Стандарт А	0,008	0,009	0,0085		0
Стандарт В	0,059	0,064	0,0615		10
Стандарт С	0,186	0,194	0,190		30
Стандарт D	0,578	0,602	0,590		100
Стандарт Е	1,900	1,882	1,891		300
Контроль 1	0,127	0,122	0,125	20,6	20,6
Контроль 2	2,554	2,565	2,560	>300	*
Образец пациента 1	0,034	0,040	0,037	4,7	4,7
Образец пациента 2	0,104	0,098	0,101	16,3	16,3
Образец пациента 3	0,397	0,411	0,404	68,7	68,7
Образец пациента 4	2,195	2,173	2,184	>300	*

* Так как считанная концентрация >300 пг/мл, рекомендуется провести считывание при 405 нм. Пример таблицы при 405 нм. См.ниже.

Пример данных при 405 нм.

лунка	1 считывание ОП	2 считывание ОП	Среднее ОП	Кальцитонин пг/мл	Кальцитотнин пг/мл – результаты для отчета
Стандарт А	0,005	0,005	0,005		0
Стандарт D	0,187	0,198	0,193		100
Стандарт Е	0,602	0,597	0,599		300
Стандарт F	1,898	1,910	1,904		1000
Контроль 1	0,045	0,044	0,045	<300	¶
Контроль 2	0,814	0,816	0,815	403	403
Образец пациента 1	0,016	0,020	0,018	<300	¶
Образец пациента 2	0,039	0,035	0,037	<300	¶
Образец пациента 3	0,128	0,134	0,131	<300	¶
Образец пациента 4	0,697	0,689	0,693	345	345

¶ Для образцов со считаной конц. <300 пг/мл рекомендуется провести считывание при 450 нм. Такая практика должна обеспечивать результат с оптимальной чувствительностью набора.

ПРИМЕЧАНИЕ: Данные таблицы предоставлены только в качестве примера и не должны использоваться вместо данных полученных в ходе анализа.

11 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольная сыворотка исследуется в каждой постановке вместе с калибраторами и образцами пациента. Результаты, полученные в ходе анализа контрольных образцов, должны оцениваться на приемлемость с использованием соответствующих статистических методов. В исследованиях, в которых одно или более значений контрольного образца находится вне допустимого диапазона, результат образца пациента может быть недействителен.

12 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Набор реагентов для определения кальцитонина пр-ва ДРГ не показал «хук эффекта» на образцах с 1,000,000 пг/мл чистого интактного кальцитонина (1-32). Эти образцы показали результат более максимального стандарта, т.е. 1,000 пг/мл. Образцы с уровнем кальцитонина более максимального калибратора необходимо разводить и повторно исследовать на верные значения.
- Как любой анализ, используемый в диагностике, результат кальцитонина с осторожностью вместе с общими клиническими представлениями и другими вспомогательными диагностическими тестами.
- **Образцы сывороток пациентов, которые регулярно взаимодействуют с животными или продуктами животного происхождения, могут содержать гетерофильные антитела, вызывающие нетипичные результаты. Этот тест был разработан для снижения риска этого типа вмешательств. Тем не менее, возможно взаимодействие между редкими сыворотками и компонентами теста.**

13 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой референс-диапазон. Данные должны использоваться только в качестве ориентира. Уровни кальцитонина измерялись у 59 здоровых женщин и 52 мужчин с использованием набора реагентов ДРГ.

Данные полученные у женщин находились в пределах от 0.1 до 10.9 пг/мл, данные полученные у мужчин - от 0,2 до 27,7 пг/мл.

Геометрическая средняя \pm 2 стандартных отклонения дают диапазон 0,07 – 12,97 пг/мл для нормальных женщин и 0,68-30,26 пг/мл для нормальных мужчин.

Согласно литературным источникам уровни кальцитонина у женщин, в основном был немного ниже, чем у мужчин. Отсюда, референс-диапазон должен быть менее чем 13 и 30 пг/мл, для женщин и мужчин соответственно.

14 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точность

77 образцов пациентов со значениями кальцитонина от 0,8 до 3,113 пг/мл были исследованы по методике ДРГ ИФА и РИА Кальцитонин (IRMA KIT). Анализ линейной регрессии дает следующую статистику:

ДРГ ИФА = 0,940 IRMA KIT + 6,55 пг/мл $r=0,993$ $N=123$

Кроме того 51 образец со значениями кальцитонина от <0,7 до 2,240 пг/мл были исследованы по методике ДРГ ИФА и хемилюминесцентным методом (ICMA). Анализ линейной регрессии дает следующую статистику:

ДРГ ИФА = 1,094 ICMA KIT - 6,13 пг/мл $r=0,995$ $N=123$

14.2 Чувствительность

Чувствительность, или минимальный определяемый уровень данного анализа определяется как минимальное отдельное значение, которое может определяться от нуля по 95% доверительному пределу. Ифа-набор для определения кальцитонина имеет расчетную чувствительность **1 пг/мл**.

14.3 Прецизионность и воспроизводимость.

Прецизионность (вариации интра-анализа) ифа-набора для определения кальцитонина была рассчитана по 20 репликатам для каждого из трех образцов.

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

Общая прецизионность (вариации интер-анализа) набора Кальцитонин ИФА рассчитывалась по данным трех образцов, полученных в ходе 15 различных анализов, тремя специалистами по двум различным лотам реагентов за период трех недель.

INTRA-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 Восстановление

Различные количества Кальцитонина были добавлены к 4 – м различным сывороткам пациента для определения восстановления. Результаты приводятся в таблице:

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 Специфичность и кросс-реактивность:

Crossreactant	Concentration of Crossreactant	Calcitonin without Crossreactant [pg/mL]	Calcitonin with Crossreactant [pg/mL]	Change in Calcitonin [pg/mL]	% Crossreactivity
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%
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 uIU/mL	198	203	5	0.00061%
	500 uIU/mL	198	198	0	0.00000%
	50 uIU/mL	198	199	1	0.01220%

Каждый кросс-реагент добавляется в образец, содержащий кальцитонин. Уровень кальцитонина измеряется перед и после добавления. Ни один из кросс-реактивных реагентов не повлиял на результат данного анализа. Измеренные небольшие изменения уровня кальцитонина находятся в пределах статистики интра-анализа.

14.6 Кинетический эффект

Для того, чтобы определить, есть ли какой либо системный кинетический эффект между началом и концом постановки, три усиленных пула пациентов с репрезентативными показателями концентрации АКТГ были помещены в последовательности в течение всей постановки на одной плашке или 96 лунках (на 12-ти восьмилучных стрипах).

14.7 Линейность разведений образцов пациента: параллелизм

Шесть образцов пациентов были разведены Калибратором А (нулевым). Результаты в пг/мл приведены ниже:

Sample	Dilution	Expected	Observed	% Observed \pm Expected
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%
F	Undiluted	-	>1000	-
	1:2	-	997	-
	1:4	499	429	86%
	1:8	249	223	89%
	1:16	125	119	95%

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. Parthemore, 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. Hennessey, 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. Tieg 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.