

Test calcitonina ELISA [saggio immunoenzimatico]

REF 7024

Analisi quantitativa specifica per la determinazione
della calcitonina nel siero

luglio 2018



I. USO PREVISTO

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

II. 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.

III. 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 monomeric) 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'iperparatiroidismo e nell'iperparatiroidismo.

IV. PRINCIPIO DEL TEST

Il saggio immunoenzimatico calcitonina Biomerica 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 micropiastre rivestite 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.

V. 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 ricostituzione 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 [1 N acido solforico]	1 x 20 mL
PLA = Micropiastre	Contenitore con strisce rivestite di streptavidina	12 strisce per 8 pozzetti
CAL = Calibratori A: 0 pg/mL B: C: Le concentrazioni esatte sono riportate D: sull'etichetta delle E: provette F:	h-calcitonina sintetica liofilizzata. Calibratore zero liofilizzato [soluzione BSA]. Tutti gli altri calibratori: h-calcitonina (1-32) in soluzione BSA, calibrata secondo lo standard OMS 2nd IS 89/620	1 x 2 mL per calibratore zero 1 x 1 mL per altri calibratori
CTRL = Controlli 1 e 2	Liofilizzati. 2 livelli. h-calcitonina (1-32) sintetica in soluzione BSA	1 x 1 mL per livello

I valori esatti sono riportati sull'etichetta delle provette

MATERIALI E STRUMENTAZIONE NECESSARI (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: Biomerica 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 (0,118 in)	600 ± 10 giri/minuto
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 giri/minuto
Lineare	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 giri/minuto

VI. 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'aggitatore per micropiastre non rientri nell'intervallo sopra specificato, il laboratorio dovrà definire il proprio intervallo ottimale.

VII. 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.

VIII. PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

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

- 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 ~ 8°C.
- Ricostituire il calibratore A (standard zero) con 2 µL 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 µL 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".
- 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.

IX. PROCEDURA DI ANALISI

- Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori calcitonina, A-F tra i CALIBRATORI di 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 9 per la lettura finale della micropiastre.
- 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.**
- Aggiungere o versare **50 µL** di reagente 1 (anticorpo biotilinato) in ciascun pozzetto contenente i calibratori, controlli e campioni.
- Aggiungere o versare **50 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti.
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 **IV**) per **4 ore ± 30 minuti** a temperatura ambiente (22 ~ 28°C).
- 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.
- Aggiungere o versare **150 µL** di reagente B (substrato TMB) in ogni pozzetto, tranne nei pozzetti vuoti.
7. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione **IV**) per **30 ± 5 minuti** a temperatura ambiente (22 ~ 28°C).
- Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto, tranne nei pozzetti vuoti. Mescolare delicatamente.
- Prima della lettura, accertarsi che entrambi i "pozzetti vuoti" 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 vuoti. *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 "vuoto", per ottenere i risultati sottrarre il valore di assorbanza "vuoto" 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. Pertanto 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.

- 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.

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 biotilinato) e il reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) in un flacone pulito color ambrato. 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.

X. CALCOLO DEI RISULTATI

Metodo manuale

- 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).
- 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.
- 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.

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 distillata o deionizzata)

Pozzetto micropiastre	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	Calcitonina pg/mL	Calcitonina pg/mL - Risultato
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 campione a 405 nm** nella tabella seguente.

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

Pozzetto micropiastrea	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	Calcitonina pg/mL	Calcitonina pg/mL – Risultato
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 campione 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.

XI. 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 campioni di controllo qualità sono al di fuori dei limiti accettabili, i risultati per il campione del paziente potrebbero non essere validi.

XII. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il kit calcitonina ELISA Biomerica 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 del test.

XIII. 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.

XIV. CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

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:

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

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:

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

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 Biomerica ha una sensibilità calcolata a 1,0 pg/mL.

Precisione e riproducibilità

La precisione (variazione intra-saggio) del test calcitonina ELISA Biomerica PTH 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 Biomerica 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

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)	Calcitonina 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%

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(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%
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 uIU/ml	198	203	5	0,00061%
	500 uIU/ml	198	193	0	0,00000%
	50 uIU/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 cross-reagente interferisce con il test calcitonina ELISA. Le piccole variazioni di calcitonina misurate sono comprese tra i dati statistici di precisione intra-saggio.

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 micropiastre o di 96 pozzetti (con dodici strisce per 8 pozzetti). I risultati non indicano una deriva significativa dell'analisi.

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	Diluizione	Previsto	Osservato	% 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%

XV. BIBLIOGRAFIA


- 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.
- 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.
- Travis, J.C., (ed) Clinical Radioimmunoassay . . . State-of-the-Art, **Scientific News Letters, Inc.** Radioassay - Legend Assay Publishers, Anaheim, CA 92803, 1980, 1st Edition.
- Austin, L.A., and Heath, H., III, Medical Progress, Calcitonin Physiology and Pathophysiology, **N. Engl. J. Med.** 304:269,1981.
- Pathmore, 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.
- Hennedssy, 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.
- 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.
- 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
- 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.

XVI. SIMBOLI

	Temperatura di conservazione
	Codice di lotto
	Scadenza
	Fabbricante
	Rappresentante autorizzato
	Attenzione, vedere le istruzioni
	All'impiego diagnostico in vitro
	n. ° de Catálogo

XVII. INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

ORDINAZIONE Inviare un ordine d'acquisto al seguente indirizzo:

 BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, CA 92614
U.S.A.

2°C / 8°C

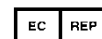
Telefono: +1 949 645 2111
Fax: +1 949 553 1231
URL: www.biomerica.com
E-mail: bmra@biomerica.com





67024-09_ita.doc

luglio 2018



secondo IVDD 98/79/CE
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Germania