

# Calcitonin ELISA

REF 7024

## Spezifischer quantitativer Assay zur Bestimmung von Calcitonin im Serum

Juli 2018



### I. VERWENDUNGSZWECK

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

### II. 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.

### III. 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<sup>1</sup>. MTC geht häufig mit anderen klinischen Merkmalen einher. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Heilung mittels operativen Eingriffs. Selten kann der Tumor familiär vererbt<sup>1,3,4</sup> 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 unterscheiden<sup>1</sup>. 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<sup>5</sup> oder Pentagastrin<sup>6</sup> oder deren kombinierte Verabreichung<sup>7</sup>. 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<sup>8</sup> 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 3 400 (monomere Form) bis zu 70 000 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 Inselzelltumoren 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.

### IV. TESTPRINZIP

Der Calcitonin Immunoassay von Biomerica 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. In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in

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

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.

### V. 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 = ELISA Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergen]	1 x 30 ml
RGT B = ELISA 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: C: Genue D: Konzentrationen E: auf F: 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“ (WHO 2nd IS 89/620).	1 x 2 ml für den Nullkalibrator 1 x 1 ml für alle anderen Kalibratoren
CTRL = Kontrollen 1 & 2 Genue Bereiche auf Flaschenetiketten	Lyophilisiert, 2 Level. Synthetisches h-Calcitonin 1-32 in BSA-Lösung.	1 x 1 ml je Level

### WEITERE 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: Biomerica 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

### VI. 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.

## VII. 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 Antikoagulantien 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 oder extrem lipämische Proben sind zu vermeiden.

## VIII. VORBEREITUNG DER REAGENZEN UND LAGERUNG

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

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2-8°C.
2. Kalibrator A (Nullstandard) mit 2,0 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Jeden der Nicht-Nullkalibratoren (Kalibrator 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. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren 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.

## IX. TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F der Calcitonin-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Qualitätskontrollseren und Patientenproben ausreichende Anzahl **Streptavidin-beschichteter Streifen** in die Halterung einsetzen. Bieten Sie zwei Vertiefungen als "Leer". Siehe Schritt #9 dieses Abschnitts.
2. **100 µl** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen oder 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. Platte **4 Stunden ± 30 Minuten** bei Raumtemperatur (22°-28°C) auf einem Schüttler inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt V).
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Vertiefungen fünf (5) Mal mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensationsmenge ist auf 0,35 ml je Vertiefung einzustellen.
6. **150 µl** des Reagenz B (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren, außer in den Blindproben.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22°-28°C) auf einem **Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt V).
8. **100 µl** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren, außer in den Blindproben. Vorsichtig mischen.
9. Vor der Messung sicherstellen, dass beide Blindproben gemäß Schritt 1 mit 250 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllt sind. Mikrotiterplatten-

Lesegerät mithilfe der Blindproben gemäß Herstelleranweisungen auf Leerwert einstellen.\*Innerhalb von 10 Minuten die Absorption der Lösung in den Vertiefungen bestimmen, wozu ein auf **450 nm**. eingestelltes Mikrotiterplatten-Lesegerät verwendet wird. Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen..

*\*Wenn das ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät nicht mit Blindproben auf null eingestellt werden kann, subtrahieren Sie den Blindproben-Absorptionswert 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) auszuweiten. 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.*

10. 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.

## 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. 1 000 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.

## X. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### 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.

### Automatisch

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

**Beispieldaten bei 450 nm** [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

Mikrotiterplatten-Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	Calcitonin pg/ml	Calcitonin pg/ml – Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,008	0,009	0,0085		0
Kalibrator B	0,059	0,064	0,0615		10
Kalibrator C	0,186	0,194	0,190		30
Kalibrator D	0,578	0,602	0,590		100
Kalibrator 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 gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

Mikrotiterplatten-Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	Calcitonin pg/ml	Calcitonin pg/ml – Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,005	0,005	0,005		0
Kalibrator D	0,187	0,198	0,193		100
Kalibrator E	0,602	0,597	0,599		300
Kalibrator F	1,898	1,910	1,904		1000
Kontrolle 1	0,045	0,044	0,045	< 300	¶
Kontrolle 2	0,814	0,816	0,815	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.

## XI. 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 Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, sind die Ergebnisse der Patientenproben möglicherweise ungültig.

## XII. GRENZEN DES VERFAHRENS

Der Biomerica 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 Aufnahme von Proben 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.

## XIII. ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwerte ermitteln. Die angegebenen Referenzbereiche sollten nur als *Richtlinie* dienen. Mithilfe des Biomerica 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  $\pm$  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<sup>2,9</sup> 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.

## XIV. LEISTUNGSMERKMALE

### Genauigkeit

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

$$\text{Biomerica ELISA} = 0,940 \text{ IRMA Testkit} + 6,55 \text{ pg/mL} \quad r = 0,993 \quad N = 100$$

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

$$\text{Biomerica ELISA} = 1,094 \text{ ICMA Testkit} - 6,13 \text{ pg/mL} \quad r = 0,995 \quad N = 122$$

### 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 Biomerica Calcitonin ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,0 pg/ml.

### Präzision und Reproduzierbarkeit

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

#### Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variations – Koeffizient %
A	24,3	20	5,7
B	94,9	20	4,3
C	403,0	20	2,8

Die Gesamtpräzision (Inter-Assay-Abweichung) des Biomerica 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	Variations – Koeffizient %
A	16,5	15	7,4
B	64,5	15	7,4
C	340,0	15	6,1

### Wiederfindung

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

Serumprobe	Endogenes Calcitonin (pg/ml)	Calcitonine Zugesetzt (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 4,6	-- 126 220	-- 131 225	-- 119 203	-- 91 % 90 %
---	-------------------	------------------	------------------	------------------	--------------------

### Spezifität und Querempfindlichkeit

Kreuzreaktant	Konzentration des Kreuzreaktants	Calcitonin Ohne Kreuzreaktant [pg/ml]	Calcitonin mit Kreuzreaktant [pg/ml]	Veränderung Von Calcitonin [pg/ml]	% Querempfindlichkeit
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	0,00800%
Calcitonin-Gen verwandtes Peptid (CGRP)	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 uIU/ml	198	203	5	0,00061%
	500 uIU/ml	198	193	0	0,00000%
	50 uIU/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.

### 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.

### Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität

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

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

### XV. LITERATURANGABEN:

- Defetos, 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.
- Defetos, 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.

- Pathemore, J.G., Bronzert, G.R., and Defetos, 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. SYMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Stapelcode
	Ablauf
	Hersteller
	Autorisierter vertreter
	Achtung, Siehe Anweisungen
	Für die <i>in vitro</i> -Diagnostik vorgesehen
	Katalog-Nr.

### XVII. BEZUGSNACHWEIS

BESTELLUNGEN: Bestellungen sind zu richten an:

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

2°C / 8°C

Telefon: +1-(949) 645-2111  
Fax: +1-(949) 553-1231  
Website: www.biomerica.com  
E-Mail: bmra@biomerica.com

67024-09\_ger.doc

Juli 2018

gemäß IVDD 98/79/ EC  
MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover  
Deutschland