



DCM181-1
Ed. 01/2015

Calcitonin

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica della concentrazione di Calcitonina in siero umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO181

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Calcitonina in siero umano.

Il kit Calcitonin è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La Calcitonina è un ormone tiroideo secreto dalle cellule C parafollicolari della tiroide, che agisce sui livelli di calcio, modulando la capacità di "clearance" del calcio renale e riducendo il riassorbimento osseo. Non è ancora chiaro però il risultato fisiologico di questa modulazione.

Un eccesso di Calcitonina nel tessuto sanguigno può essere indicativo dell'insorgenza del tumore maligno "carcinoma tiroideo midollare" (MTC), che nella maggior parte dei casi (80%) compare sporadicamente, ma che ha anche una componente familiare (20%).

Un moderato aumento di Calcitonina nel sangue invece è riscontrabile negli stati di gravidanza, anemia perniziosa, disfunzione renale e durante il periodo neonatale.

Pertanto la quantificazione della Calcitonina nel tessuto sanguigno può essere utile principalmente nella diagnosi e follow-up di MTC, ma anche nello studio della fisiopatologia del calcio e del metabolismo osseo.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Diametra Calcitonin è basato sulla cattura simultanea dell'antigene da parte di due anticorpi monoclonali (uno coattato sulla micropiastre, l'altro legato a perossidasi di rafano) e successiva quantificazione tramite substrato cromogenico.

Nella prima fase si ha una incubazione di calibratori, controlli e campioni dei pazienti all'interno della micropiastre insieme al reagente coniugato; gli anticorpi anti Calcitonina formano un sandwich con l'antigene, bloccando la Calcitonina nei pozzetti della micropiastre. Al termine dell'incubazione, la micropiastre viene lavata con una soluzione di lavaggio per la rimozione delle componenti che non hanno reagito.

La detezione del segnale derivato dalla perossidasi di rafano (HRP) all'interno dei pozzetti è effettuata tramite aggiunta di una soluzione substrato cromogenica contenente TMB. Dopo il periodo di

incubazione si blocca lo sviluppo del colore mediante aggiunta della Stop Solution. Il colore della soluzione diventa giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di Calcitonina presente nel campione. La concentrazione di Calcitonina nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, liofilati)

CAL0	REF DCE002/18106-0
CAL1	REF DCE002/18107-0
CAL2	REF DCE002/18108-0
CAL3	REF DCE002/18109-0
CAL4	REF DCE002/18110-0
CAL5	REF DCE002/18111-0

2. Controls (2 flaconi, liofilati)

Control 1	REF DCE045/18104-0
Control 2	REF DCE045/18105-0

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi

3. 50X Conjugate (1 flacone, 0,125 mL)

Anticorpi monoclonali anti Calcitonina coniugati con perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/18102-0

4. Conjugate buffer (1 flacone, 6 mL)

Tampone Tris, BSA REF DCE002/18101-0

5. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Anticorpi monoclonali anti Calcitonina adsorbiti su micropiastre REF DCE002/18103-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 12 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) REF DCE004/18104-0

7. Stop Solution (1 flacone, 12 mL)

Acido Cloridrico 0,1N (evitare il contatto con la pelle) REF DCE005/18105-0

8. 200X Conc. Wash Solution (1 flacone, 10 mL)

Tris-HCl buffer REF DCE067/18167-0

9. Serum (1 flacone, liofilo)

Siero umano REF DCE053/18153-0

10. Serum buffer (1 flacone, 8 mL)

Buffer borato REF DCE032/18132-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Timolo come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido cloridrico diluito. L'acido cloridrico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di $2-8^{\circ}\text{C}$ nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono

chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di campioni.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori devono essere ricostituiti **immediatamente prima dell'uso** con **0.5 mL di acqua distillata o deionizzata**. Lasciare in agitazione fino alla solubilizzazione del materiale.

Le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette e sul Certificato di Analisi, per ogni specifico lotto.

I Calibratori ricostituiti devono essere conservati a -20°C per un massimo di 3 mesi; effettuare al massimo 1 ciclo di congelamento e scongelamento (se necessario prevedere delle aliquote).

I Calibratori sono tarati contro lo Standard Internazionale NIBSC 89/620: 1 pg di calibratore corrisponde a 0,19 μIU di Standard Internazionale.

6.2. Preparazione dei Controlli (1 e 2)

Procedere allo stesso modo dei Calibratori.

Il range di accettabilità dei controlli è indicato nel Certificato di Analisi.

6.3. Preparazione del Coniugato

Immediatamente prima dell'uso e nella quantità necessaria, diluire 1:50 il Conjugate (reagente 3) con Conjugate buffer (reagente 4); il coniugato diluito è stabile 1 settimana a 2-8°C.

Il Conjugate (reagente 3) non diluito, dopo apertura del flacone rimane stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta a 2-8°C ben chiuso.

6.4. Preparazione della Wash Solution

Diluire 1:200 la "200X Conc. Wash Solution" con acqua distillata o deionizzata nella quantità necessaria; **preparare la soluzione di lavaggio immediatamente prima dell'uso e scartare la soluzione diluita non utilizzata.**

La soluzione di lavaggio non diluita rimane stabile a temperatura ambiente (22-28°C) fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

6.5. Preparazione del Campione

La determinazione della Calcitonina con questo kit può essere effettuata su siero umano.

Se il dosaggio non viene effettuato entro 24 ore dal prelievo conservare il campione in aliquote a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento.

Non utilizzare campioni emolizzati o lipemici.

6.6. Preparazione del Serum (reagente 9)

Il reagente Serum va utilizzato per diluire eventuali campioni la cui quantificazione è fuori dalla curva di calibrazione.

Ricostituire il Serum liofilizzato (reagente 9) con Serum buffer (reagente 10) secondo la quantità indicata in etichetta per ogni specifico lotto.

Miscelare bene prima dell'uso.

Il Serum ricostituito deve essere conservato a -20°C per un massimo di 3 mesi; effettuare al massimo 1 ciclo di congelamento e scongelamento (se necessario prevedere delle aliquote).

6.7. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).**
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	100 µL		
Campione/Controllo		100 µL	
Coniugato diluito	50 µL	50 µL	
Incubare 18 (±1) ore a 2-8°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,4 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 30 minuti al buio a temperatura ambiente (22÷28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Calcitonina per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato.

Occorrerebbe compilare delle tabelle di controllo di qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Si suggerisce di utilizzare metodi statistici adeguati per verificare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con le prove precedenti. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento non osservato delle condizioni sperimentali o la degradazione dei reagenti del kit. In questo caso si consiglia di utilizzare reagenti freschi per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

Se il campione è fuori dalla curva di calibrazione, diluire con Serum ricostituito (reagente 9).

9. VALORI DI RIFERIMENTO

80 campioni di soggetti normali sono stati testati per stabilire il seguente range di normalità:

	Calcitonin (pg/mL)
Range normalità	< 11 pg/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando la misura di due differenti sieri. La variabilità intra-assay è $\leq 3,9\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando la misura di due differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 6,0\%$.

10.2. Specificità

La specificità del kit Calcitonin è stata verificata nei confronti delle seguenti sostanze potenzialmente interferenti testate in concentrazioni di 100 ng/mL:

Sostanza	Interferenza
CGRP	NO
Calcitonina di salmone	NO
PDN 21	NO
Procalcitonina N-terminale	NO

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Calcitonina misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,7 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Graze K., Spiler I.J., Tashjian A.H., Melvin K.E.W., Cervi-Skinner S., Gagel R.F., Miller H.H., Wolfe H.J., Delellis R.A., Leape L., Feldman Z.T. And Reichlin S. (1978) *Natural History Of Familial Medullary Thyroid Carcinoma; Effect Of A Program For Early Diagnosis*. Engl. J. Med., 299,18;980-985.
2. Hennessy J.F., Wells S.A., Ontjes D.A. And Cooper C.W. (1974) *A Comparison Of Pentagastrin Injection And Calcium Infusion As Provocative Agents For The Detection Of Medullary Carcinoma Of The Thyroid*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:487-495.
3. Rougier Ph., Calmettes C., Laplanche A., Travaglini J.P., Lefevre M., Parmentier C., Milhaud G. And Tubiana M. (1983) *The Values Of Calcitonin And Carcinoembryonic Antigen In The Treatment And Management Of Nonfamilial Medullary Thyroid Carcinoma*. Cancer, 51,5:856-862.
4. Wallach S.R., Royston I., Taetle R., Wohl H. And Deftos L. (1981) *Plasma Calcitonin As A Marker Of Disease Activity In Patients With Small Cell Carcinoma Of The Lung*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53,3:602-606.
5. Wells S.A., Baylin S.B., Linehan W.M., Farrell R.E., Cox E.B. And Cooper C.W. (1978) *Provocative Agents And The Diagnosis Of Medullary Carcinoma Of The Thyroid Gland*. Ann. Surg., 188,2:139-141.
6. Aurbach G.D., Marx S.J. And Spiegel A.M. (1985) *Parathyroid Hormone, Calcitonin, And The Calciferols*. In: Williams Textbook Of Endocrinology (7th Edition; Wilson J.D. And Foster D.W. Eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1137-1217.
7. Body J.J. Et Al. (1987) *ScC Antigen And Other Tumor Markers In Lung Cancer: Preliminary Results*. Excerpta Medica, 162-170.
8. Nicoli P. Et Al. (1995) *Abnormal Calcitonin Basal Levels And Pentagastrin Response In Patients With Chronic Renal Failure On Maintenance Hemodialysis*. Eur. J. Endocrinol. 132, 1, 75-81.
9. Pacini F. Et Al. (1994) *Routine Measurement Of Serum Calcitonin In Modular Disease Allows The Preoperative Diagnosis Of Unsuspected Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma*. J. Clin. Endocrinol. Metab. Excerpta Medica, 78, 4, 824-9.
10. Quesada J. M. Et Al. (1994) *Calcitriol Corrects Deficient Calcitonin Secretion In The Vit. D Deficient Elderly*. J Bone Miner Res. 1994, 9(1):53-7.

Ed. 01/2015

DCM181-1

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM181-1
Ed. 01/2015

Calcitonin

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of Calcitonin concentration in human serum

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO181

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Calcitonin concentration in human serum.

Calcitonin kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Calcitonin is a hormone secreted by the parafollicular C cells of the thyroid gland, that acts on calcium levels by modulating the ability to "clearance" of renal calcium and reducing bone resorption. It is unclear, however, the physiological result of this modulation.

An excess of Calcitonin in the blood tissue may be indicative of the onset of malignant tumor "medullary thyroid cancer" (MTC), that mainly (80% of cases) appears sporadically, but that also has a familial component (20% of cases).

A moderate increase of Calcitonin in the blood can be found in the states of pregnancy, pernicious anemia, renal dysfunction, and during the neonatal period.

Therefore, the quantification of Calcitonin in the blood tissue can be useful mainly in the diagnosis and follow-up of MTC, but also in the study of the pathophysiology of calcium and bone metabolism.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

Diametra Calcitonin assay is based on the simultaneous capture of the antigen by two monoclonal antibodies (one coated on the microplate, the other linked to horseradish peroxidase) and subsequent quantification via a chromogenic substrate.

In the first phase an incubation of calibrators, controls and patient samples in the microtiter plate with the conjugate reagent is carried out; antibodies to Calcitonin form a sandwich with the antigen, blocking Calcitonin in the wells of the microplate

After incubation, the microplate is washed with a washing solution for the removal of components that have not reacted.

Finally, a chromogenic substrate solution containing TMB is added. After the incubation, the reaction is stopped by adding the Stop Solution. The color of the solution turns yellow.

The amount of color developed is directly proportional to the concentration of Calcitonin in the sample.

The concentration of Calcitonin in the sample is calculated through a calibration curve .

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, lyophilized)

CAL0	REF DCE002/18106-0
CAL1	REF DCE002/18107-0
CAL2	REF DCE002/18108-0
CAL3	REF DCE002/18109-0
CAL4	REF DCE002/18110-0
CAL5	REF DCE002/18111-0

2. Controls (1 vial, lyophilized)

Control 1	REF DCE045/18104-0
Control 2	REF DCE045/18105-0

See Control concentration on the Certificate of Analysis

3. 50X Conjugate (1 vial, 0.125 mL)

Monoclonal anti Calcitonin antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/18102-0

4. Conjugate buffer (1 vial, 6 mL)

Tris buffer, BSA REF DCE002/18101-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with monoclonal anti Calcitonin antibodies REF DCE002/18103-0

6. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact) REF DCE004/18104-0

7. Stop Solution (1 vial, 12 mL)

Chloridric acid 0.1N (avoid any skin contact) REF DCE005/18105-0

8. 200X Conc. Wash Solution (1 vial, 10 mL)

Tris-HCl buffer REF DCE067/18167-0

9. Serum (1 vial, lyophilized)

Human serum REF DCE053/18153-0

10. Serum buffer (1 vial, 8 mL)

Borate buffer REF DCE032/18132-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Thymol as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted chloridric acid solution. Chloridric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibration (C₀...C₅)

Calibrators should be reconstituted **immediately before use with 0.5 mL of distilled or deionized water**. Shake gently until solubilization of material.

The exact concentrations of the Calibrators are stated on the labels and Certificate of Analysis for each specific lot.

Reconstituted calibrators must be stored at -20°C for a maximum of 3 months; carry out only 1 cycle of freezing and thawing (if necessary aliquot the reconstituted Calibrators).

The calibrators are calibrated against the International Standard NIBSC 89/620: 1 pg of calibrator corresponds to 0.19 µIU of International Standard.

6.2. Preparation of the Controls (1 and 2)

Proceed as the Calibrators.

Acceptability range of Controls is stated on the Certificate of Analysis.

6.3. Preparation of the Conjugate

Immediately before using, prepare the required amount of Conjugate by diluting 1:50 the Conjugate (Reagent 3) with Conjugate buffer (Reagent 4); diluted conjugate is stable 1 week at 2-8°C.

After opened, the Conjugate (reagent 3) not diluted is stable until expiry date stated on the label at 2-8°C, tightly closed.

6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute 1:200 the "200X Conc. Wash Solution" with deionized or distilled water in the needed quantity; **prepare the diluted washing solution immediately before use and discard the diluted solution not used.**

Concentrated wash solution is stable at room temperature (22-28°C) until the expiry date stated on the label.

6.5. Preparation of the Sample

The determination of the Calcitonin with this kit can be carried out on human serum.

If the determination is not made within 24 hours of collection sample, storage the sample in aliquots at -20°C.

Avoid cycles of freezing and thawing.

Do not use hemolyzed or lipemic samples.

6.6. Preparation of the Serum (reagent 9)

Serum reagent is used to dilute any samples whose quantification is outside the calibration curve.

Reconstitute the lyophilized Serum (reagent 9) with Serum buffer (reagent 10) according to the quantity in mL indicated on the label for each specific lot.

Mix well before use.

Reconstituted Serum must be stored at -20°C for a maximum of 3 months; carry out only 1 cycle of freezing and thawing (if necessary aliquot the reconstituted Serum).

6.7. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).**
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	100 µL		
Sample/ Control		100 µL	
Diluted Conjugate	50 µL	50 µL	
Incubate 18 (±1) hours at 2-8°C. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 400 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 30 minutes in the dark at room temperature (22÷28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Calcitonin for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

If the sample is outside the calibration curve, dilute with reconstituted Serum (reagent 9).

9. REFERENCE VALUES

80 samples from healthy subjects were tested to establish the following normal range:

	Calcitonin (pg/mL)
Normal range	< 11 pg/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay

Within run variation was determined by replicate the measurement of two different samples in one assay. The within assay variability is $\leq 3.9\%$.

10.1.2. Inter Assay

Between run variation was determined by replicate the measurement of two different samples in different lots. The between assay variability is $\leq 6.0\%$.

10.2. Specificity

Specificity of Calcitonin kit has been checked against the following potentially interfering substances tested in concentrations of 100 ng/mL:

Substance	Interference
CGRP	No
Salmon Calcitonin	No
PDN 21	No
N-terminal procalcitonin	No

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Calcitonin that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.7 pg/mL at the 95% confidence limit.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Graze K., Spiler I.J., Tashjian A.H., Melvin K.E.W., Cervi-Skinner S., Gagel R.F., Miller H.H., Wolfe H.J., Delellis R.A., Leape L., Feldman Z.T. And Reichlin S. (1978) *Natural History Of Familial*

Medullary Thyroid Carcinoma; Effect Of A Program For Early Diagnosis. Engl. J. Med., 299,18;980-985.

2. Hennessy J.F., Wells S.A., Ontjes D.A. And Cooper C.W. (1974) *A Comparison Of Pentagastrin Injection And Calcium Infusion As Provocative Agents For The Detection Of Medullary Carcinoma Of The Thyroid*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 39:487-495.
3. Rougier Ph., Calmettes C., Laplanche A., Travagli J.P., Lefevre M., Parmentier C., Milhaud G. And Tubiana M. (1983) *The Values Of Calcitonin And Carcinoembryonic Antigen In The Treatment And Management Of Nonfamilial Medullary Thyroid Carcinoma*. Cancer, 51,5:856-862.
4. Wallach S.R., Royston I., Taetle R., Wohl H. And Deftos L. (1981) *Plasma Calcitonin As A Marker Of Disease Activity In Patients With Small Cell Carcinoma Of The Lung*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53,3:602-606.
5. Wells S.A., Baylin S.B., Linehan W.M., Farrell R.E., Cox E.B. And Cooper C.W. (1978) *Provocative Agents And The Diagnosis Of Medullary Carcinoma Of The Thyroid Gland*. Ann. Surg., 188,2:139-141.
6. Aurbach G.D., Marx S.J. And Spiegel A.M. (1985) *Parathyroid Hormone, Calcitonin, And The Calciferols*. In: Williams Textbook Of Endocrinology (7th Edition; Wilson J.D. And Foster D.W. Eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1137-1217.
7. Body J.J. Et Al. (1987) *ScC Antigen And Other Tumor Markers In Lung Cancer: Preliminary Results*. Excerpta Medica, 162-170.
8. Nicoli P. Et Al. (1995) *Abnormal Calcitonin Basal Levels And Pentagastrin Response In Patients With Chronic Renal Failure On Maintenance Hemodialysis*. Eur. J. Endocrinol. 132, 1, 75-81.
9. Pacini F. Et Al. (1994) *Routine Measurement Of Serum Calcitonin In Modular Disease Allows The Preoperative Diagnosis Of Unsuspected Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma*. J. Clin. Endocrinol. Metab. Excerpta Medica, 78, 4, 824-9.
10. Quesada J. M. Et Al. (1994) *Calcitriol Corrects Deficient Calcitonin Secretion In The Vit. D Deficient Elderly*. J Bone Miner Res. 1994, 9(1):53-7.

Ed. 01/2015

DCM181-1

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs