

hCalcitonin [I-125] IRMA KIT

(REF: RK-83CT)

Der ¹²⁵I-hCalcitonin IRMA KIT erlaubt die direkte quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Calcitonin in humanem Serum. Calcitonin kann in einem Bereich von 0-2000 pg/mL unter Verwendung von 100 µL Serum Probe verwendet werden. Jedes Kit enthält ausreichend Material für 100 Tests und erlaubt die Erstellung einer Standardkurve und die Testung von 42 unbekanntem Proben sowie 2 Kontrollen in Duplikat Ansätzen.

Einleitung

Calcitonin (MW 3,4 kDa) wird vorrangig von parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse sekretiert.

Das reife Peptidhormon besteht aus 32 Aminosäuren. Die biologischen Effekte von Calcitonin beeinflussen die Zielorgane: Knochen, Niere und Gastrointestinal Trakt. Die genaue physiologische Rolle von Calcitonin im Knochenstoffwechsel ist noch nicht völlig gesichert und wird immer noch untersucht. Es ist allgemein bekannt, dass abnormal erhöhte Calcitonin Werte für eine Schilddrüsen C-Zell Hyperplasie und das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) charakteristisch sind. MTC repräsentiert 5-10% aller Schilddrüsen Krebsarten und existiert entweder als familiär oder sporadisch auftretende Form. Die Bestimmung von Calcitonin in humanem Serum wird für die Diagnose und Überwachung von MTC und für die Diagnose von präklinischen Fällen der familiären Form von MTC empfohlen. In Blutproben können verschiedene Formen von Calcitonin gefunden werden, d.h. monomere, dimere und polymere Formen sowie Fragmente und Vorläufer des ausgereiften Hormones.

Testprinzip

In diesem immunradiometrischen Assay (IRMA) werden zwei hochaffine monoklonale Antikörper verwendet. Der Iod-125 markierte Signalantikörper bindet an ein Epitop des Calcitonin-Moleküls welches sich von dem zweiten biotin markierten Fängerantikörper unterscheidet. Die beiden Antikörper reagieren gleichzeitig mit dem vorhandenen Antigen in den Standards und den Proben, wodurch Fängerantikörper-Antigen-Signalantikörper-Komplexe, auch „Sandwich“ genannt, gebildet werden. Die Immunkomplexe werden während der über Nacht dauernden Inkubationszeit an die reaktive Oberfläche der Streptavidin beschichteten Teströhrchen gebunden. Das Reaktionsgemisch wird anschließend verworfen, die Teströhrchen ausgiebig gewaschen und dann die Radioaktivität der gebundenen Immunkomplexe in einem Gamma-Counter Messgerät gemessen. Die Antigenkonzentration ist direkt proportional zu der gemessenen Radioaktivität in den Teströhrchen. Anhand der mitgelieferten Kalibratoren und deren definierten Konzentrationen wird eine Eichkurve erstellt

und aus dieser die Calcitonin Konzentrationen der unbekanntem Patientenproben ermittelt.

Mitgelieferte Reagenzien

- 1 Flasche TRACER, gebrauchsfertig. 11 mL pro Flasche, enthält < 740 kBq ¹²⁵I-signal und biotinylierten Fängerantikörper in Puffer mit rotem Farbstoff und 0,1 % NaN₃.
- 6 Flaschen STANDARD (6 x 1 mL) lyophilisiert, in Pferdeserum mit 0,1 % NaN₃. Die genaue Konzentration ist dem QC Datenblatt zu entnehmen. (Kalibriert gegen den Internationalen WHO Standard, 89/620). *Siehe Vorbereitung der Reagenzien.*
- 2 Flaschen KONTROLLEN, niedrig (CI) und hoch (CII). Lyophilisiert, in humanem Serum mit 0,1 % NaN₃. *Siehe Vorbereitung der Reagenzien.* Die Konzentrationen der Kontrollen sind dem beigefügten QC Datenblatt zu entnehmen.
- 1 Flasche VERDÜNNER (DILUENT), gebrauchsfertig. 2,0 mL pro Flasche, Pferdeserum mit 0,1 % NaN₃.
- 2 Schachteln BESCHICHTETE RÖHRCHEN (COATED TUBES), gebrauchsfertig. 2x50 reaktive Röhrchen, 12x75 mm, in Plastikschachteln verpackt.
- 1 Flasche WASCHPUFFER KONZENTRAT (WASH BUFFER CONCENTRATE) (20 mL), enthält 0,2% NaN₃. *Siehe Vorbereitung der Reagenzien.*

QC Datenblatt

Arbeitsanleitung

Benötigtes Material

- Herkömmliches Labormaterial
- 100 µL Präzisionspipetten
- 100 µL Wiederholungspipette
- Multipetten bzw. Dispensette für 2,0 mL Volumen
- Plastikfolie zum Abdecken der Röhrchen
- Saugfähiges Papier
- Gamma-Counter

Probensammlung und Lagerung

Die Serumproben können nach den gängigen Verfahren, welche routinemäßig in klinischen Laboren verwendet werden, vorbereitet werden. Die Proben können bei 2-8 °C gelagert werden, wenn der Assay innerhalb von 24 h durchgeführt wird, ansonsten sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren werden. Eingefrorene Proben sollten, bevor sie für den Test eingesetzt werden, vollständig aufgetaut sein und gründlich durchgemischt werden.

Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung

Fügen Sie dem Waschpuffer-Konzentrat (20 mL) 700 mL destilliertes Wasser hinzu, um eine Gesamtmenge von 720 mL Waschlösung zu erhalten. Nach der Verdünnung kann die Waschlösung bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum des Kits gelagert werden.

Fügen Sie den lyophilisierten Kontrollseren und den Kalibratoren 1 mL destilliertes

Wasser hinzu und durchmischen Sie diese vorsichtig durch Schütteln oder Vortexen (Schaumbildung sollte vermieden werden). Vergewissern Sie sich, dass eine vollständige Lösung erfolgt ist und equilibrieren Sie die Lösung mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Für den weiteren Gebrauch müssen rekonstituierte Standards und Kontrollen bei -20 °C bis zum Verfallsdatum des Kits gelagert werden.

Lagern Sie den Rest der Reagenzien nach dem Öffnen zwischen 2-8 °C. Bei dieser Temperatur sind die Reagenzien bis zum angegebenen Verfallsdatum des Kits stabil.

Testdurchführung*(Kurzanleitung siehe Tabelle 1.)*

1. Bringen Sie alle Reagenzien und Serumproben vor Gebrauch auf Raumtemperatur. Homogenisieren Sie durch behutsames Mischen und vermeiden Sie Schaumbildung.
2. Beschriften Sie je zwei beschichtete Teströhrchen für jeden Kalibrator (S0-S5), jede Kontrolle (CI, CII) und Probe. Zur Bestimmung der Totalaktivität beschriften Sie optional 2 normale Röhrchen.
3. Geben Sie 100 µL Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechend beschrifteten Röhrchen, ohne dabei den inneren Röhrchenboden mit der Pipettenspitze zu berühren. Benutzen Sie einen Ständer für die Röhrchen.
4. Geben Sie 100 µL des Tracers in jedes Röhrchen.
5. Schütteln Sie alle Röhrchen vorsichtig und decken Sie alle Röhrchen mit einer Plastikfolie ab.
6. Inkubieren Sie die Röhrchen für 16-24 Stunden bei Raumtemperatur.
7. Geben Sie 2 mL der verdünnten Waschlösung in jedes Röhrchen (außer bei der Totalaktivität). Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer der Totalaktivität) oder dekantieren Sie den Überstand und lassen die Röhrchen 2 Minuten umgedreht auf einem saugfähigen Papier stehen.
8. Wiederholen Sie den Waschschritt zwei Mal (insgesamt 3 Waschvorgänge).
9. Messen Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter für mind. 60 Sekunden.
10. Berechnen Sie die Calcitonin Konzentrationen der Proben wie unter „Berechnung der Ergebnisse“ beschrieben oder benutzen Sie eine spezielle Software.

Tabelle 1: Kurzanleitung, Pipettierschema (alle Volumina in µL)

Röhrchen	Total	Kalibrator	Kontrolle	Proben
Kalibrator		100		
Kontrolle			100	
Proben				100
Tracer	100	100	100	100
Votexen, 16-24 Stunden inkubieren bei Raumtemperatur				
Waschlösung		2000	2000	2000
Überstand absaugen oder dekantieren				
Waschlösung		2000	2000	2000
Überstand absaugen oder dekantieren				
Waschlösung		2000	2000	2000
Überstand absaugen oder dekantieren				
Messen der Radioaktivität (60 Sek/Röhrchen)				
Berechnen der Konzentrationen				

Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung wird hier unter Verwendung repräsentativer Daten erklärt. Ihre ermittelten Testdaten sollten denen in Tabelle 2 dargestellten ähneln. Berechnen Sie den Mittelwert aus den „counts per minute“ (CPM) für jeden Doppelansatz. Berechnen Sie mit Hilfe der folgenden Formel, den normalisierten Bindungsprozentsatz für jeden Kalibrator beziehungsweise jede Probe und Kontrolle:

$$B/T (\%) = \frac{S_1 - S / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Zeichnen Sie eine Standardkurve, indem Sie den B/T (%) für jeden Kalibrator gegen die dazugehörige Calcitonin Konzentration auf semi-logarithmischen Millimeterpapier eintragen. Berechnen Sie die Calcitonin Konzentration für jede unbekannt Probe durch Interpolation aus der Standardkurve. Werte außerhalb des Bereichs der Standardkurve werden nicht extrapoliert.

Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

Automatische Auswertungssysteme sind verfügbar und zu empfehlen.

Tabelle 2: Typische Testwerte

Röhrchen	Mittelwert cpm	B/T%
T	303 022	-
S0	182	0,06
S1	1 459	0,42
S2	4 759	1,51
S3	15 195	4,95
S4	46 921	15,4

S5	143 589	47,3
CI	2 804	0,87
CII	9 714	3,15

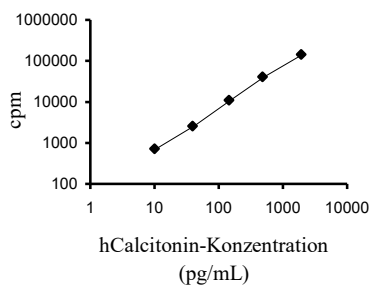


Abb.1: typische Standardkurve (nicht zur Berechnung der Proben verwenden!)

Assay Charakteristik

Sensitivität

Die Grenzen des Blank (LoB), der Nachweisgrenze (LoD) und der Quantitätsgrenze (LoQ) wurden in Übereinstimmung mit den CLSI-Richtlinien, Dokument EP17, bestimmt.

Grenzwert des Blank (LoB): 0,65 pg/mL

Nachweisgrenze (LoD): 1,2 pg/mL

Grenzwert der Quantität (LoQ): 2,0 pg/mL

Die funktionale Sensitivität ist gleich dem Grenzwert der Quantität (LoQ).

Präzision und Reproduzierbarkeit

7 Proben wurden in 20-fach Bestimmung/Replikaten bestimmt, um die Intra-Assay Präzision zu ermitteln. Um die Inter-Assay Präzision zu ermitteln wurden 7 Proben in 20 unabhängigen Assays von drei verschiedenen Bedienern unter Verwendung von drei verschiedenen Kit Batches bestimmt.

Die Werte sind nachfolgend aufgeführt:

Proben	Intra-assay		Inter-assay	
	Mittelwert (pg/mL)	CV%	Mittelwert (pg/mL)	CV%
1	0,9	17,4	1,8	21,9
2	23,6	2,7	24,9	5,1
3	25,3	3,2	28,2	6,0
4	161,2	1,6	170,5	6,1
5	180,8	4,4	198,0	6,6
6	348,3	1,7	364,4	6,4
7	782,3	1,4	812,4	6,4

Wiederfindung

Als Wiederfindung („Recovery“) bezeichnet man die erwartete messbare Konzentrationserhöhung einer Serumprobe nach Zugabe von definierten Calcitonin Mengen in Prozent („spiking“).

4 unterschiedliche Patientenserumproben wurden mit bekannter Calcitonin-Konzentration in drei verschiedenen Leveln versetzt und anschließend die wiedergefundene Konzentration in den jeweiligen Proben gemessen. Die

durchschnittliche prozentuale Wiederfindung betrug 110,9 %. Das höchste Ergebnis war 122,0 % und das niedrigste Ergebnis lag bei 100,8 %.

Spezifität

Die in diesem Assay verwendeten monoklonalen Antikörper sind spezifisch für humanes Calcitonin.

Interferenzen von humanem Procalcitonin in dem Assay können bis zu einer Procalcitonin Konzentration von $\leq 129,0$ ng/mL nicht detektiert werden.

Linearität

Die polynomielle Bewertung der Linearität wurde in Übereinstimmung mit der CLSI EP6-A Leitlinie durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Methode von 2,0 pg/mL (LoQ) bis 1859,93 pg/mL linear ist, mit einer Abweichung von 10 % in diesem Intervall.

Interferenzen

Es wurden keine Interferenzen bis zu folgender Konzentration beobachtet:

Bilirubin = 428 µmol/L,

Triglyceride = 12,1 mmol/L,

Hämoglobin = 12,2 g/L,

Biotin = 50 ng/mL

Levothyroxine = 10,0 µg/mL

Ascorbinsäure = 100,0 µg/mL

Hook Effekt

Das Kit hat keinen „Hook Effekt“ mit Calcitoninwerten bis zu 300 000 pg/mL. Proben, von denen erwartet wird, dass sie Konzentrationen aufweisen, die über dem höchsten Standard liegen, sollten mit dem Verdünnungsserum verdünnt und erneut untersucht werden. Sequenzielle Verdünnungen 1:10 werden empfohlen.

Referenzintervall

Basierend auf der Messung von 607 vermutlich gesunden adulten Serumproben (304 weiblich und 303 männlich) liegt der erwartete Bereich von Calcitonin bei **0 - 10 pg/mL** (99,8 % der Proben).

Es wird empfohlen, dass jedes Labor unabhängig seine eigenen Normalwerte erstellt.

Einschränkungen

- Die im Kit enthaltenen Reagenzien sind für die Messung der Calcitonin Level in humanem Serum optimiert.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Reagenzien und Proben.
- Hämolytische und lipämische Proben können zu falschen Werten führen und sollten nicht verwendet werden.
- Die Ergebnisse dieses Tests sollten immer im Zusammenhang mit anderen entsprechenden klinischen Informationen gesehen werden.
- In einigen pathologischen Situationen kann Calcitonin ohne diagnostischen oder prognostischen Wert erhöht sein, z.B. in einigen Fällen von Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Hypergastrinämie und akuter Pankreatitis.

Hinweise zur Durchführung

Die Nichtbeachtung dieser Anleitung kann die Resultate Signifikant beeinflussen.

Es sollten keine Komponenten verschiedener Lots oder von unterschiedlichen Herstellern gemischt oder vertauscht werden.

Fehlerquelle! Die reaktiven Teströhrchen sind in Plastiksachteln verpackt und nicht extra beschriftet. Achten Sie darauf, diese nicht mit normalen Teströhrchen zu vermischen. Nehmen Sie daher nie mehr Röhrchen aus der Plastiksachtel als Sie wirklich benötigen. Es wird empfohlen, Teströhrchen mit einem Marker zu beschriften.

Warn- und Sicherheitshinweise

Radioaktivität

Dieses Produkt enthält radioaktives Material. Es liegt in der Verantwortung des Nutzers die lokalen Bestimmungen oder gesetzliche Vorschriften die das Umgehen mit radioaktivem Material betreffen einzuhalten.

Potenziell infektiöses Material

Die in diesem Kit verwendeten humanen Blutprodukte stammen von gesunden Spendern. Sie wurden individuell mit anerkannten Methoden (EIA, Enzym Immunassay) negativ auf das Vorhandensein von Humanem Immunodeficiency Virus Antikörper (Anti-HIV-1/2), Hepatitis-C Antikörper (anti-HCV), Treponema Antikörper und Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg) getestet. Beim Umgang mit humanen Proben die in diagnostischen Kits getestet werden, sollte immer große Sorgfalt walten gelassen werden.

Auch wenn eine Person negativ getestet wurde, kann keine Methode komplette Sicherheit gewähren, dass keine infektiösen Erreger vorhanden sind. Daher sollten humane Blutproben grundsätzlich wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Alle tierischen Produkte und Bestandteile wurden von gesunden Tieren gewonnen. Trotzdem sollten die Komponenten welches tierisches Material enthalten als *potentiell infektiöses Material* behandelt werden.











Chemische Gefährdung

Die Komponenten enthalten Natrium Azid als antimikrobielles Mittel. Bei der Entsorgung des Abfalls sollte mit ausreichend Wasser nachgespült werden, um die Anhäufung von explosivem metallischem Azid in Kupfer- und Bleirohren zu vermeiden. Die Gesamtmenge von Azid in jedem Paket beträgt 61 mg.

Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie dieses Produkt bei einer Temperatur von 2-8 °C.

Haltbarkeit: 67 Tage ab Verfügbarkeit.

	Verwendbar bis	CONTROL	Kontrolle
	Chargencode	CAL	Standard
	Vorsicht, beiliegende Unterlagen beachten	CT	Beschichtetes Röhrchen
	Biologisches Risiko	TRAC	Tracer
	Bedienungsanleitung beachten	WASHB	Waschpuffer
	In-vitro-Diagnostikum	DIL	Serum-verdünnungsmittel
	Hersteller		Temperaturbegrenzung Bei 2-8 °C lagern
REF	Katalognummer		
	Radioaktives Material		

Website: <http://www.izotop.hu>

Technische E-mail: immuno@izotop.hu

Kommerzielle E-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: (36-1)392-2577, Fax: (36-1)395-9247

Aktualisiert: Juli 2022