



IVD

CE

hOST-ELISA

KAP1381

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

hOST-ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of intact human Osteocalcin (OST) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource hOST-ELISA Kit
- B. Catalogue number :** KAP1381 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. CLINICAL BACKGROUND







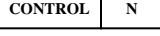
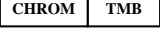
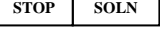
- A. Biological activities**
Osteocalcin or bone Gla protein (B.G.P) is the major non-collagen protein of the bone matrix. It has a molecular weight of 5800 Da and contains 49 amino-acids, including 3 residues of gamma carboxyl glutamic acid. Osteocalcin is synthesized in the bone by the osteoblasts. After production, it is partly incorporated in the bone matrix and the rest is found in the blood circulation. The exact physiological function of osteocalcin is still unclear. A large number of studies show that the circulating levels of osteocalcin reflect the rate of bone formation.
- B. Clinical application**
The determination of the blood levels of osteocalcin is valuable for :
- . The identification of women at risk of developing osteoporosis
 - . Monitoring bone metabolism during the perimenopause and postmenopause
 - . Monitoring bone metabolism during hormone replacement therapy and treatment of premenopausal women with LH-RH agonists
 - . Monitoring bone metabolism in patients with growth hormone deficiency, hypothyroidism, hyperthyroidism, chronic renal failure.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIIAsource hOST-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on breakable microtiterplates. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of human osteocalcin. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAB 1 – human osteocalcin – MAB 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB ready for use) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the osteocalcin concentration.

A calibration curve is plotted and OST concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti OST (monoclonal antibodies) coated breakable wells	96 wells	blue	Ready for use
 Conjugate buffer: TRIS-HCl buffer with bovine serum albumin, bovine casein, EDTA, gentamycin and thymol	1 vial 12 ml	red	Ready for use
 Conjugate: HRP labelled anti-OST (monoclonal antibodies) in Stabilizing Buffer	1 vial 0.4 ml	yellow	Dilute 50 x with conjugate buffer
 Zero calibrator in human plasma with protease inhibitors and benzamidin	1 vial lyophilized	yellow	Add 1 ml distilled water
 Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with protease inhibitors and benzamidin	5 vials lyophilized	yellow	Add 1 ml distilled water
 Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human plasma with protease inhibitors, benzamidin and thymol	2 vials lyophilized	silver	Add 1 ml distilled water
 Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	black	Ready for use
 Stop Solution: HCl 1N	1 vial 12 ml	white	Ready for use

- Note:**
- Use the zero calibrator for sample dilutions.
 - The DIIAsource OST calibrator is calibrated on a synthetic peptide (Peninsula 6045).

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- High quality distilled water
- TrasyloI® at 10000IU/ml
- Pipettes for delivery of: 25 µl, 100 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Washer for Microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator and other calibrators with 1 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- Working anti-OST-HRP conjugate** : Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding 40 µl of the concentrated anti-OST-HRP conjugate to 2 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused wells must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximally 6 weeks. Freezing should be performed immediately after use, do not wait for freezing until all the samples are pipetted. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the concentrated conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Collect blood by venipuncture, taking care to avoid haemolysis, the samples must be kept in an ice bath. Separate the serum from the cells within 3 hours, the use of a refrigerated centrifuge is recommended. Add 100 µl TrasyloI® (10000IU/ml) to the serum immediately after centrifugation (to obtain 1000 IU TrasyloI® per ml sample). With this treatment the samples are stable for 3 days at 2-8°C. For a longer delay the samples have to be frozen (-20°C), however the samples can only be thawed once! For repeat testing freeze the samples in aliquots and discard each sample after the first thawing.
- Do not use haemolysed samples or lipemic samples.

X. PROCEDURE

- Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be no longer than 30 minutes.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

- Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
- Secure the wells into the holding frame.
- Pipette 25 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Pipette 100 µl of working anti-OST-HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 2 hours at room temperature.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
- Pipette 100 µl of the chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature horizontal and avoid direct sunlight.
- Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
- Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- Plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of OST (abscissa) and draw a calibration curve.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

If Trasylol® is added to the samples (100 µl/ml), sample values have to be multiplied by 1.1.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

hOST-ELISA		OD units
Calibrator	0.0 ng/ml	0.033
	1.56 ng/ml	0.118
	4.1 ng/ml	0.229
	12.7 ng/ml	0.641
	31.5 ng/ml	1.420
	75 ng/ml	2.415

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.08 ng/ml.

B. Specificity

This method detects intact human osteocalcin. N-terminal and C-terminal fragments have been tested at their maximum levels found in normal and pathological samples, were added to a low and a high value calibrator. No cross reactivity was observed at these concentrations.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added OST (ng/ml)	Recovered OST (ng/ml)	Recovery (%)
Serum	1.4	1.56	111
	4.04	4	99
	8.4	8.3	99
	15	14.5	97
	31	31	100
	64.6	64.4	100

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
1	1/1	-	28.6
	1/2	14.3	14.2
	1/4	7.1	7.1
	1/8	3.6	3.4
	1/16	1.8	1.4
2	1/1	-	30.8
	1/2	15.4	15
	1/4	7.7	7.7
	1/8	3.8	3.7

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Hook effect

A sample spiked with OST up to 625 ng/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Normal values are expected between 5 to 25 ng/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl, the chromogenic solution contains TMB and H₂O₂. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

For more information, refer to the MSDS.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
 The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
 Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
 Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
 Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
5. L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
 Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
 Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings".
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Calibrators (0-5) Samples, Controls Working Anti-OST-HRP conjugate	25 - 100	- 25 100
Incubate for 2 hours at room temperature. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 30 min at room temperature .		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lees het hele protocol vóór gebruik.

hOST-ELISA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van intact humaan osteocalcine (OST) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. Gedeponoerd handelsmerk:** DIAsource hOST-ELISA kit
- B. Catalogusnummer:** KAP1381 : 96 tests
- C. Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:
Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 90

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteiten

Osteocalcine of bot-GLA-eiwit (B.G.P) is het voornaamste niet-collageen proteïne van de botmatrix. Het heeft een moleculair gewicht van 5800 Da en bevat 49 aminozuren, waaronder 3 residuen van gamma carboxyl glutamisch zuur. Osteocalcine wordt gesynthetiseerd in het bot door de osteoblasten. Na productie wordt het gedeeltelijk geïncorporeerd in de botmatrix en de rest wordt in de bloedcirculatie aangetroffen. De exacte fysiologische functie van osteocalcine is nog onduidelijk. Een groot aantal studies toont aan dat de spiegels van circulerend osteocalcine het botvormingsgehalte weergeven.

B. Klinische toepassing



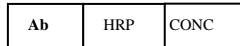
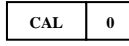
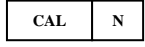
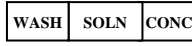

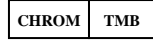
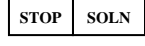
De vaststelling van de spiegels van osteocalcine in het bloed is waardevol voor:

- . De identificatie van vrouwen met risico op de ontwikkeling van osteoporose.
- . Opvolgen van het botmetabolisme gedurende de perimenopauze en de postmenopauze.
- . Opvolgen van het botmetabolisme gedurende hormoonvervangings therapie en de behandeling van premenopausale vrouwen met LH-RH agonisten.
- . Opvolgen van het botmetabolisme bij patiënten met groeihormoondeficiëntie, hypothyroïdisme, hyperthyroïdisme, chronisch nierfalen.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

De DIASource hOST-ELISA is een "solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay" uitgevoerd op breekbare microtiterplaten. De test gebruikt monoklonale antilichamen (MAbs) gericht tegen verschillende epitopen van humaan osteocalcine. Kalibrators en monsters reageren met het monoklonale vangantilichaam (MAB 1) gecoat op een putje en met een monoklonaal antilichaam (MAB 2) gelabeld met "horseradisch" peroxidase (HRP). Na een incubatieperiode die de vorming van een sandwich mogelijk maakt: gecoate MAB 1 – humaan osteocalcine – MAB 2 – HRP, wordt de microtiterplaat gewassen om ongebonden antilichaam gelabeld met enzyme te verwijderen. Gebonden antilichaam gelabeld met enzyme wordt gemeten door een chromogene reactie. Een chromogene oplossing (gebruiksklare TMB) wordt toegevoegd en geïncubeerd. De reactie wordt gestopt door de toevoeging van de Stopoplossing en de microtiterplaat wordt dan gelezen op de gepaste golflengte. De hoeveelheid substraat turnover wordt colorimetrisch bepaald door meting van de absorptie, die proportioneel is met de osteocalcineconcentratie. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de OST-concentratie in de monsters wordt bepaald door interpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleurcode	Reconstitutie
 Microtiterplaat met 96 anti OST (monoklonale antilichamen) gecoate breekbare putjes	96 putjes	blauw	Klaar voor gebruik
 Conjugaat buffer: TRIS-HCl buffer met bovien serumalbumine, bovine caseïne, EDTA, gentamycine en thymol	1 flacon 12 ml	rood	Klaar voor gebruik
 Conjugaat: anti -OST gelabelled met HRP (monoklonale antilichamen) in stabilizerende buffer	1 flacon 0,4 ml	geel	50x met conjugaat buffer verdunnen
 Nulkalibrator in humaan plasma met benzamidine en protease inhibitoren	1 flacon gevries-droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen
 Kalibrator - N = 1 tot 5 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in humaan plasma met benzamidine en protease inhibitoren	5 flacon gevries-droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen
 Was oplossing (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	bruin	200 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
 Controles - N = 1 or 2 in humaan plasma met benzamidine, protease inhibitoren en thymol	2 flacon gevries-droogd	zilver	1 ml gedestilleerd water toevoegen
 Chromogene TMB Oplossing (Tetramethylbenzidine)	1 flacon 12 ml	zwart	Klaar voor gebruik
 Stopoplossing: HCl 1N	1 flacon 12 ml	wit	Klaar voor gebruik

Opmerking: 1. Gebruik Nulkalibrator voor monsterverduinningen
2. De DIASource OST kalibrator wordt gekalibreerd op een synthetische peptide (Peninsula 6045).

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedestilleerd water.
- Trasylo® aan 10000IU/ml
- Pipetten voor een volume van 25 µl, 100 µl, 500 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Wasser voor de Microtiterplaten
- Microtiterplaatlezer in staat tot lezen bij 450 nm en 650 nm (bichromatische lezing)

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Kalibrators:** Reconstitueer de nulkalibrator en de andere kalibrators met 1 ml gedestilleerd water.
- Controles:** Reconstitueer de controles met 1 ml gedestilleerd water.
- Werkend Anti-OST-HRP conjugaat:** Bereid een voldoende hoeveelheid conjugaat oplossing door 40 µl van het geconcentreerde conjugaat (50x) toe te voegen aan 2 ml conjugaat buffer. Gebruik een vortexmenger voor de homogenisering. Bereiding op het ogenblik zelf wordt aanbevolen.
- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 199 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (200 x). Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Ongebruikte putjes moeten bewaard worden bij 2-8°C, in een verzegelde zak met een droogmiddel tot de vervaldatum.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en de controles heel onstabiel, gebruik hen onmiddellijk na reconstitutie. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 6 weken. Invriezen moet onmiddellijk na gebruik gebeuren, wacht niet met invriezen tot alle monsters gepipetteerd zijn.
- De geconcentreerde Wasoplossing is stabiel bij kamertemperatuur tot de vervaldatum.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is het geconcentreerde conjugaat houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Verzamel bloed door venepunctie; let erop hemolyse te vermijden; de monsters moeten in een ijsbad bewaard worden. Scheidt het serum van de cellen binnen 3 uur; het gebruik van een gekoelde centrifuge is aanbevolen. Voeg 100 µl Trasylo® (10000IU/ml) aan het serum toe onmiddellijk na het centrifugeren (om 1000 IU Trasylo® per ml sample te bekomen). Met deze behandeling zijn de monsters stabiel voor 3 dagen bij 2-8°C. Voor een langere periode moeten de monsters worden ingevroren (-20°C), hoewel de monsters slechts één maal ontdooid kunnen worden! Bevries voor herhaalde bepaling de monsters in aliquots en dank elk monster af na het eerste ontdooiden.
- Gebruik geen gehemolyseerde monsters of lipemische monsters.

X. PROCEDURE

- Opmerkingen bij de procedure**
Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik. Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden,

moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

- Selecteer het vereiste aantal putjes voor de test. De ongebruikte putjes moeten opnieuw verzegeld worden in de zak met een droogmiddel en bewaard bij 2-8°C.
- Bevestig de putjes in de houder.
- Pipetteer 25 µl van elke Kalibrator, Controle en Monster in de gepaste putjes.
- Pipetteer 100 µl werkende anti-OST-HRP conjugaat in alle putjes.
- Incubeer gedurende 2 uur bij kamertemperatuur
- Aspireer de vloeistof van elk putje.
- Was de plaat 3 maal door:
 - 0.4 ml Wasoplossing te verspreiden in elk putje
 - De inhoud van elk putje te aspireren
- Pipetteer 100 µl van de chromogene oplossing in elk putje binnen 15 minuten volgend op de wasfase.
- Incubeer de microtiterplaat gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur, vermijd direct zonlicht.
- Pipetteer 100 µl van het Stopreagens in elk putje.
Lees de absorbanties bij 450 nm (referentiefilter 630 nm of 650 nm) binnen 1 uur en bereken de resultaten zoals beschreven in sectie XI.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Lees de plaat bij 450 nm tegen een referentiefilter gezet op 650 nm (of 630 nm).
- Bereken het gemiddelde van de dubbele bepalingen.
- Zet voor elke kalibrator de OD waarden (ordinaat) uit tegen de overeenkomstige OST-concentratie (abscis) en teken een kalibratiecurve.
- Lees de concentratie voor elke controle en monster door interpolatie op de kalibratiecurve.
- Deze berekeningen worden vergemakkelijkt met door de computer geassisteerde datareductie. Als een automatische verwerking van de resultaten wordt gebruikt, bevelen wij een 4 parameter logistische functie curveopbouw aan.

Als Trasyol® aan de monsters wordt toegevoegd (100 µl/ml), moeten de waarden van de monsters vermenigvuldigd worden met 1,1.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

hOST-ELISA		OD eenheden
Kalibrator	0,0 ng/ml	0,033
	1,56 ng/ml	0,118
	4,1 ng/ml	0,229
	12,7 ng/ml	0,641
	31,5 ng/ml	1,420
	75 ng/ml	2,415

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,08 ng/ml.

B. Specificiteit

Deze methode detecteert intact humaan osteocalcine. N-terminale en C-terminale fragmenten, op hun maximale spiegels gevonden in normale en in pathologische monsters, werden toegevoegd aan een kalibrator met een hoge waarde en aan een kalibrator met een lage waarde. Er werd geen kruisreactiviteit geobserveerd bij deze concentraties.

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST

Monster	Toegevoegd OST (ng/ml)	Recovery van OST (ng/ml)	Recovery (%)
Serum	1.4	1.56	111
	4.04	4	99
	8.4	8.3	99
	15	14.5	97
	31	31	100
	64.6	64.4	100

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
1	1/1	-	28,6
	1/2	14,3	14,2
	1/4	7,1	7,1
	1/8	3,6	3,4
	1/16	1,8	1,4
2	1/1	-	30,8
	1/2	15,4	15
	1/4	7,7	7,7
	1/8	3,8	3,7

De monsters zijn verdund met Nulkalibrator.

E. "Hook"-effect

Een monster, dat met OST gespiked werd tot 625 ng/ml, levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Controles die azide bevatten zullen de enzymatische reactie beïnvloeden en kunnen niet gebruikt worden.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.
- Het wordt aanbevolen dat de Controles als routine bepaald worden als onbekende monsters om de variabiliteit van de test te meten. De prestatie van de bepaling moet bekeken worden met kwaliteitscontroletabellen van de controles.
- Het wordt aanbevolen om de curve geselecteerd door de computer visueel na te kijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

Gezonde subjecten bekwamen waarden gaande van 5 tot 25 ng/ml (2,5 tot 97,5 percentielen).

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsers behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd contact met de huid met alle reagentia, de Stopoplossing bevat HCl₄, de chromogene oplossing bevat TMB en H₂O₂. In geval van contact grondig wassen met water.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

Raadpleeg het MSDS voor meer informatie.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
 The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
 Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
 Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
 Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
5. L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
 Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
 Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings".
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	KALIBRA-TORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -5) Monsters, Controles Werkend anti-OST-HRP conjugaat	25 - 100	- 25 100
Incubeer voor 2 uur bij kamertemperatuur. Aspireer de inhoud van elk putje. Was 3 maal met 400 µl Wasoplossing en aspireer.		
Chromogene oplossing	100	100
Incubeer voor 30 minuten bij kamertemperatuur		
Stopoplossing	100	100
Lees op een microtiterplaatlezer en stel de absorptantie van elk putje vast bij 450 nm (versus 630 of 650 nm)		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hOST-ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem intaktem Osteocalcin (OST) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource hOST-ELISA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1381 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75
E-mail Ordering : ordering@diasource.be


III. KLINISCHER HINTERGRUND

- A. **Biologische Aktivität**
Osteocalcin oder Knochen Gla Protein ist das bedeutendste nicht-kollagene Protein der Knochenmatrix. Es hat ein Molekulargewicht von 5.800 Da und beinhaltet 49 Aminosäuren, inklusiv 3 Gamma-Carboxyglutamatsäure-Reste. Osteocalcin wird in den Osteoblasten synthetisiert. Nach seiner Bildung ist es zu 80% in die Knochenmatrix inkorporiert. Der Rest wird in die Blutzirkulation abgegeben. Die genaue physiologische Bedeutung von Osteocalcin ist bisher noch unklar. Eine große Anzahl von Publikationen zeigt, dass die zirkulierenden Werte von Osteocalcin die Rate der Knochenformation reflektieren.
- B. **Klinische Anwendung**
Die Bestimmung der Blutwerte von Osteocalcin ist nützlich für:
- . die Identifizierung von Frauen mit erhöhtem Risiko zur Osteoporose;
 - . Monitoring des Knochenmetabolismus während der Peri- und Postmenopause;
 - . Monitoring des Knochenmetabolismus während hormoneller Ersatztherapie und der Behandlung prämenopausaler Frauen mit LH-RH Antagonisten;
 - . Monitoring des Knochenmetabolismus von Patienten mit Wachstumshormonmangel, Hypothyreose und Hyperthyreose, chronischer Niereninsuffizienz.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hOST-ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im brechbaren Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAK), die gegen verschiedene Epitope von humanem osteocalcin gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAK 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAK 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAK 1 – humanem osteocalcin - MAK 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farbblösung (gebrauchsfertiges TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur osteocalcin Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die OST-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Farb-Code	Rekonstitution			
 Mikrotiterplatte mit 96 anti OST-beschichtete brechbare Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	Blau	gebrauchsfertig			
<table border="1" data-bbox="98 936 258 967"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Konjugat Puffer: TRIS-HCl-Puffer mit Rinderserumalbumin, Rinder-casein, EDTA, Gentamycin und Thymol	CONJ	BUF	1 Gefäß 12 ml	Rot	gebrauchsfertig	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="67 1102 290 1146"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Konjugat: MRP-beschriftete Anti-OST (monoklonale Antikörper) in Stabilisierungspuffer	Ab	HRP	CONC	1 Gefäß 0,4 ml	Gelb	50 x mit Konjugat Puffer verdünnen
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="82 1258 204 1290"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null-Kalibrator in Humanplasma mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	1 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="82 1402 204 1433"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	1 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1568 268 1599"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="82 1680 242 1711"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mit Benzamidin, Proteaseinhibitoren und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	Silber	1 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="82 1814 226 1845"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Farbblösung TMB (Tetramethylbenzidin)	CHROM	TMB	1 Gefäß 12 ml	Schwarz	gebrauchsfertig	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="82 1935 210 1966"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stopplösung: HCL 1N	STOP	SOLN	1 Gefäß 12 ml	Weiß	gebrauchsfertig	
STOP	SOLN					

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. Der DIASource OST-Kalibrator wird auf einem synthetischen Peptid kalibriert (Peninsula 6045).

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Trasylol® (10.000 IE/ml)
3. Pipetten: 25 µl, 100 µl, 500 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
4. Vortex Mixer
5. Magnetrührer
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
7. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (bichromatische Auswertung)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator, die anderen Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- C. Gebrauchsfertiges Anti-OST-HRP Konjugat:** Bereiten Sie ein entsprechendes Volumen der Konjugatlösung durch Zugabe von 40 µl des konzentrierten Anti-OST-HRP Konjugats zu 2 ml Konjugatpuffer zu. Verwenden Sie einen Vortex Mixer zum gleichmäßigen Durchmischen. Es wird empfohlen, die Lösung frisch zuzubereiten
- D. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nicht verwendete Wells sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Die Kalibratoren und Kontrollen sind sehr instabil, sie sind sofort nach der Rekonstitution zu verwenden. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden während max. 6 Wochen. Sofort nach Gebrauch einfrieren, mit dem Einfrieren nicht warten, bis alle Proben pipettiert sind. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das konzentrierte Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Blutabnahme durchführen, dabei auf Vermeidung einer Hämolyse achten. Die Proben müssen in einem Eisbad gelagert werden. Serum sollten innerhalb von 3 Stunden von den Zellen separiert werden, die Nutzung einer Kühlzentrifuge ist ratsam. Unmittelbar nach der Zentrifugation sind dem Serum 100 µl Trasylol® (10.000 IE/ml) hinzuzufügen (um 1.000 IE Trasylol® pro ml Probe zu erhalten). Mittels dieser Behandlung sind die Proben bis zu 3 Tagen bei 2 - 8°C stabil. Zur längeren Lagerung Proben sofort bei -20°C einfrieren, die Proben können jedoch nur einmal aufgetaut werden! Zum wiederholten Messen Proben aliquotiert einfrieren und Aliquote nach Gebrauch wegwerfen.
- Hämolytische oder lipämische Proben nicht verwenden!

X. DURCHFÜHRUNG

- A. Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Zur Vermeidung eines Drifts dürfen zwischen der Pipettierung des ersten Kalibrators und der letzten Probe nicht mehr als 30 Minuten verstreichen.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

Pipettieren Sie die Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.

Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

- Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Wells für den Lauf aus. Nicht verwendete Wells sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Befestigen Sie die Wells im Halterahmen.
- Pipettieren Sie jeweils 25 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- Pipettieren Sie 100 µl gebrauchsfertiges Anti-OST-HRP Konjugat in alle Wells.
- Inkubieren Sie 2 Stunde bei Raumtemperatur
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte dreimal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
 - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- Pipettieren Sie 100 µl der Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
- Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb von 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt XI beschrieben.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen für jeden Kalibrator gegen die entsprechende PTH Konzentration (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- 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.

Wenn Trasylo® zu den Proben hinzugefügt wird (100 µl/ml), müssen die Probewerte mit 1,1 multipliziert werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

hOST-ELISA		OD Einheiten
Kalibrator	0,0 ng/ml	0,033
	1,56 ng/ml	0,118
	4,1 ng/ml	0,229
	12,7 ng/ml	0,641
	31,5 ng/ml	1,420
	75 ng/ml	2,415

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,08 ng/ml.

B. Spezifität

Diese Methode detektiert das intakte Osteocalcin. N-terminale und C-terminale Fragmente, die bei normalen und pathologischen Proben gefunden wurden, wurden zu einem Kalibrator mit hohem und niedrigem Wert hinzugefügt. Bei diesen Konzentrationen wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt.

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. OST (ng/ml)	Wiedergef. OST (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	1.4	1.56	111
	4.04	4	99
	8.4	8.3	99
	15	14.5	97
	31	31	100
	64.6	64.4	100

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (ng/ml)	Gemess. Konz. (ng/ml)
1	1/1	-	28,6
	1/2	14,3	14,2
	1/4	7,1	7,1
	1/8	3,6	3,4
	1/16	1,8	1,4
	2	1/1	-
1/2		15,4	15
1/4		7,7	7,7
1/8		3,8	3,7

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

E. Hook-Effekt

Eine Probe mit OST bis zu 625 ng/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratorwert.

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.

- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Normale Werte sind zwischen 5 bis 25 ng/ml zu erwarten.

XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält HCl, Farblösung enthält TMB und H₂O₂. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

XVII. LITERATUR

- J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
The Lancet, 1091-1093.
- P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
Vitamins and hormones, 42,65-108.
- R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
- S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
- L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
- J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
- M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
- B. DEMIAUX, M.E. ARLLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N) KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen gebrauchsfertiges Anti- OST-MRP Konjugat	25 - 100	- 25 100
2 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Farblösung	100	100
30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken		

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

hOST-ELISA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro di osteocalcina intatta (OST) umana in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource hOST-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1381: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'osteocalcina o proteina Gla ossea (BGP, bone Gla protein) è la maggiore proteina non collagene della matrice ossea. Ha un peso molecolare di 5800 Da e contiene 49 aminoacidi, tra cui 3 residui di acido gamma carbossi glutammico. L'osteocalcina viene sintetizzata nelle ossa dagli osteoblasti. Dopo la produzione, viene parzialmente incorporata nella matrice ossea mentre la parte rimanente è rintracciabile in circolo. La funzione fisiologica esatta dell'osteocalcina non è ancora chiara. Numerosi studi dimostrano che i livelli circolanti di osteocalcina riflettono l'indice di formazione dell'osso.

B. Applicazione clinica

La determinazione dei livelli ematici di osteocalcina è utile per:


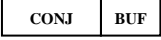
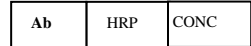
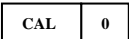
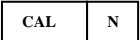

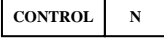
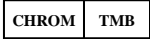
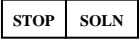
- . L'identificazione delle donne a rischio di osteoporosi
- . Il monitoraggio del metabolismo osseo durante la perimenopausa e la postmenopausa
- . Il monitoraggio del metabolismo osseo durante la terapia di sostituzione ormonale e il trattamento delle donne in premenopausa con LH-RH agonisti.
- . Il monitoraggio del metabolismo osseo nei pazienti con carenze dell'ormone della crescita, ipotiroidismo, ipertiroidismo, insufficienza renale cronica

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIASource hOST-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione frazionabili. Il saggio utilizza anticorpi monoclonali (MAbs) direttamente contro epitopi distinti dell'umana osteocalcin. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAB 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAB 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAB 1 di rivestimento – osteocalcin umana – MAB 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. La soluzione cromogenica (TMB pronta all'uso) viene aggiunta e incubata. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di osteocalcin.

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione OST nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili rivestiti anti OST (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	blu	Pronte per l'uso
 Tampone del coniugato : TRIS-HCl con BSA, caseina bovina, EDTA, gentamicina e timolo	1 flacone 12 ml	Rosso	Pronto per l'uso
 Coniugato: marcato HRP anti-OST (Anticorpi monoclonali) in Tampone Stabilizzante	1 flacone 0,4 ml	Giallo	Diluire 50 x con Tampone del Coniugato
 Calibratore zero in plasma umano contenente benzamidina e inibitori della proteasi	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano contenente benzamidina e inibitori della proteasi	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
 Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano contenente benzamidina, inibitori della proteasi e timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Soluzione TMB cromogena (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 ml	nero	Pronto per l'uso
 Soluzione di arresto: HCL 1N	1 flacone 12 ml	bianco	Pronto per l'uso

Note: 1. Usare lo standard zero per diluire i campioni.
2. Il calibratore OST DIASource è calibrato su un peptide sintetico (Peninsula 6045).

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Trasylo® a 10000IU/ml
3. Pipette per dispensare 25 µl, 100 µl, 500 µl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico.
6. lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 (lettura bicromatica)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero e gli altri calibratore con 1 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- C. Coniugato anti-OST-HRP attivo :** Preparare la quantità necessaria di soluzione del coniugato aggiungendo 40µl del coniugato anti-OST –HRP concentrato a 2 ml di Tampone del Coniugato. Usare un agitatore tipo vortex per rendere la soluzione omogenea. Si raccomanda una diluizione estemporanea.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- I pozzetti inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono molto instabili, quindi utilizzarli immediatamente dopo la ricostituzione. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C per un periodo non superiore a 6 settimane. Effettuare il congelamento immediatamente dopo l'uso, non attendere per il congelamento che tutti i campioni vengano pipettati. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato concentrato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Raccogliere il sangue per venopuntura, prestando attenzione nell'evitare l'emolisi; mantenere i campioni in un bagno di ghiaccio. Separare il siero dalle cellule entro 3 ore: si raccomanda l'uso di una centrifuga refrigerata. Aggiungere 100 µl Trasylo® (10000IU/ml) al siero immediatamente dopo la centrifugazione (per ottenere 1000 IU Trasylo® per ml di campione). Con questo trattamento i campioni sono stabili per 3 giorni a 2-8°C. Per un ritardo maggiore i campioni devono essere congelati (- 20°C), tuttavia è possibile scongelarli solo una volta! Per test in ripetizione congelare i campioni in aliquote e scartare ogni campione dopo il primo scongelamento.
- Non utilizzare campioni emolizzati o lipemici.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi.
Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.

Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.

Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.

Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

Per la distribuzione della soluzione di rivelazione e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione non deve essere superiore a 30 minuti.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

Distribuzione della Soluzione di rivelazione entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la Soluzione di rivelazione evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

- Selezionare il numero di pozzetti necessario per il test. I pozzetti inutilizzati devono essere risigillati nel contenitore con un essiccante e conservati a 2-8°C.
- Assicurare i pozzetti nel telaio di supporto.
- Pipettare 25 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
- Pipettare 100 µl della soluzione di lavoro del coniugato anti-OST-HRP in tutti i pozzetti.
- Incubare per 2 ore a temperatura ambiente.
- Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
- Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
- Pipettare 100 µl di soluzione di rivelazione preparata al momento in ogni pozzetto entro 15 minuti dalla fase di lavaggio.
- Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente in posizione orizzontale; evitare la luce diretta del sole.
- Pipettare 100 µl di reagente d'arresto in ogni pozzetto.
- Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 1 ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
- Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- Costruire la curva di calibrazione ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di PTH.
- Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

If Trasylol® is added to the samples (100 µl/ml), sample values have to be multiplied by 1,1.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di OST in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

hOST-ELISA		Unità OD
Calibratore	0,0 ng/ml	0,033
	1,56 ng/ml	0,118
	4,1 ng/ml	0,229
	12,7 ng/ml	0,641
	31,5 ng/ml	1,420
	75 ng/ml	2,415

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard.

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,08 ng/ml.

B. Specificità

Questo metodo rivela l'osteocalcina umana intatta. I frammenti N-terminale e C-terminale, rilevati ai loro massimi livelli in campioni normali e patologici, sono stati aggiunti a un calibratore a bassa e ad elevata concentrazione. Nessuna cross reattività è stata osservata a queste concentrazioni.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
1	1/1	-	28,6
	1/2	14,3	14,2
	1/4	7,1	7,1
	1/8	3,6	3,4
	1/16	1,8	1,4
2	1/1	-	30,8
	1/2	15,4	15
	1/4	7,7	7,7
	1/8	3,8	3,7

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	OST aggiunta (ng/ml)	OST recuperata (ng/ml)	Recupero (%)
Siero	1,4	1,56	111
	4,04	4	99
	8,4	8,3	99
	15	14,5	97
	31	31	100
	64,6	64,4	100

E. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta OST fino a 625 ng/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono aze interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

I soggetti sani hanno ottenuto valori compresi tra 5 e 25 ng/ml (2,5-97,5 percentili).

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti. La Soluzione di arresto contiene HCl, la soluzione cromogena contiene TMB e H₂O₂. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

Per ulteriori informazioni, consultare l'MSDS.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
5. L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Soluzione di lavoro del Coniugato anti-OST-HRP	25 - 100	- 25 100
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogena di rivelazione	100	100
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.		
Soluzione di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm)		

Leer el protocolo completo antes de usar.

hOST-ELISA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in vitro de la osteocalcina intacta (OST) humana en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource hOST-ELISA Kit
- B. Número de Catálogo:** KAP1381 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

La osteocalcina o Gla proteína ósea (B.G.P) es la proteína no colágena más importante de la matriz ósea. Tiene un peso molecular de 5800 Da y contiene 49 aminoácidos, incluso 3 residuos del ácido glutámico gamma carboxilo. La osteocalcina es sintetizada en el hueso por los osteoblastos. Después de la producción, es parcialmente incorporada en la matriz ósea y el resto se encuentra en la circulación sanguínea. La función fisiológica exacta de la osteocalcina ya no es clara. Un gran número de estudios indican que las concentraciones de osteocalcina circulante reflejan la tasa de formación ósea.

B. Aplicaciones clínicas

La determinación de los niveles de osteocalcina en la sangre es importante para:


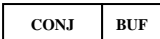

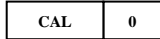
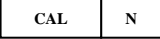
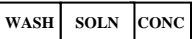
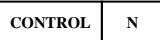
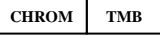
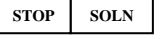
- . La identificación de mujeres que corren el riesgo de que desarrollen osteoporosis
- . Observación del metabolismo óseo durante la peri menopausia y la postmenopausia
- . Observación del metabolismo óseo durante una terapia de reemplazo de hormona y el tratamiento de mujeres premenopáusicas con agonistas LH-RH
- . Observación del metabolismo óseo en pacientes con deficiencia de la hormona de crecimiento, hipotiroidismo, hipertiroidismo, fallo renal crónico

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIASource hOST-ELISA es un Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay a fase sólida efectuado con placas de microvaloración rompibles. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (MAbs) dirigidos contra epitopes distintos de la osteocalcina humana. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo de captura monoclonal (MAB 1) recubierto en un pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (MAB 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de un periodo de incubación que permite la formación de un sandwich: MAB 1 recubierto – osteocalcina humana – MAB 2 – HRP, la placa de microvaloración se lava para quitar los anticuerpos marcados con enzimas libres. Los anticuerpos marcados con enzimas ligados se miden con una reacción cromógena. La solución cromógena (TMB listo para el uso) es añadida y incubada. La reacción se para con la adición de la Solución de Parada y después la placa de microvaloración se lee en la longitud de onda apropiada. La cantidad de recambio de sustrato es determinada de manera colorimétrica por la medición de la absorbancia, que es proporcional a la concentración de la osteocalcina.

Una curva de calibración es elaborada y la concentración OST de las muestras es determinada por interpolación de la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución
 Placa de microvaloración con anti OST (anticuerpos monoclonales) pocillos recubiertos rompibles	96 pocillos	azul	Listo para uso
 Tampón de Conjugado: tampón TRIS-HCl con albúmina bovina, caseína bovina, EDTA, gentamicina y thymol.	1 vial 12 ml	rojo	Listo para uso
 Conjugado: anti OST marcado con HRP (anticuerpos monoclonales) en Tampón Estabilizante.	1 vial 0,4 ml	amarillo	Diluir 50 x con tampón de conjugado
 Calibrador cero en plasma humano con benzamidina y inhibidores de proteasa	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
 Calibradores N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en plasma humano con benzamidina y inhibidores de proteasa	5 vial liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
 Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 Controles - N = 1 o 2 en plasma humano, benzamidina, inhibidores de proteasa y thymol.	2 vial Liofilizados	plateado	Añadir 1 ml de agua destilada
 Solución Cromógena TMB (Tetrametilbenzidina)	1 vial 12 ml	negro	Listo para uso
 Solución de Parada: HCl 1N	1 vial 12 ml	blanco	Listo para uso

Nota :

1. Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
2. El calibrador DIASource OST es calibrado con un péptido sintético (Península 6045).

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. TrasyloI® a 10000UI/ml
3. Pipetas de 25 µl, 100µl, 500 µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvaloración capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero y otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. Conjugado de trabajo anti-OST –HRP:** Prepare un volumen adecuado de solución de conjugado agregando 40 µl del conjugado concentrado anti-OST –HRP a 2 ml de tampón de conjugado. Usar un agitador magnético para homogenizar. Se recomienda preparar en el momento de uso.
- D. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 199 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (200x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los pocillos que no han sido usados deben ser almacenados entre 2 y 8°C, en una bolsa sellada que contenga un desecante hasta la fecha de expiración.
- Después de la reconstitución los calibradores y los controles son muy inestables, utilizar inmediatamente después de la reconstitución. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20°C como mucho 6 semanas. Congelar inmediatamente después del uso, no esperar a que todas las muestras sean preparadas
- La Solución de Lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado concentrado es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Recoger la sangre por venipunción, evitando la hemólisis, las muestras se deben guardar en un baño de hielo. Separar el suero de las células en menos de 3 horas, se recomienda el uso de una centrifugada refrigerada. Añadir 100 µl de TrasyloI® (10000IU/ml) al suero inmediatamente después de la centrifugación (para obtener 1000 IU de TrasyloI® al ml de muestra). Con este tratamiento las muestras están estables durante 3 días a 2-8°C. Para un período más largo las muestras se deben congelar (-20°C), aunque las muestras solamente pueden ser descongeladas una sola vez! Para ensayos repetidos congelar las muestras en alícuotas y tirar cada muestra después de la primera descongelación.
- No utilizar muestras hemolizadas o lipémicas.

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Seleccionar el nombre requerido de pocillos para el ensayo. Los pocillos sin usar tienen que ser sellados en el saco con un desecante y guardados a 2-8°C.
2. Fijar los pocillos en el soporte.
3. Pipetar 25 µl de cada Calibrador, Control y Muestra en el pocillo apropiado.
4. Pipetar 100 µl del conjugado de trabajo anti-OST-HRP en cada pocillo.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Aspirar el líquido de cada pocillo.
7. Lavar la placa 3 veces:
 - Dispensar 0,4 ml de la Solución de Lavado en cada pocillo
 - Aspirar el contenido de cada pocillo
8. Pipetar 100 µl de la solución cromógena en cada pocillo en menos de 15 minutos después de la fase de lavado.
9. Incubar la placa de microvaloración durante 30 minutos a temperatura ambiente en posición horizontal, evitar la luz solar directa.
10. Pipetar 100 µl del Reactivo de Parada en cada pocillo.
11. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en menos de 3 horas y calcular los resultados como descrito en la sección XI

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular el promedio de las determinaciones dobles.
3. Poner para cada calibrador contra la concentración de PTH correspondiente (abscisa) y construir la curva de calibración.
4. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación de la curva de calibración.
5. La reducción de datos asistido por ordenador puede facilitar estos cálculos. Si se utiliza el procesamiento de resultados automático, recomendamos la función logística de 4 parámetros.

Si Trasyol® es añadido a las muestras (100 µl/ml), los valores de las muestras se deben multiplicar por 1,1.

XI. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

hOST-ELISA		unidades OD
Calibrador	0,0 ng/ml	0,033
	1,56 ng/ml	0,118
	4,1 ng/ml	0,229
	12,7 ng/ml	0,641
	31,5 ng/ml	1,420
	75 ng/ml	2,415

XII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,08 ng/ml.

B. Especificidad

Este método detecta la osteocalcina intacta humana. Fragmentos N-terminal y C-terminal, encontrados a sus niveles máximos en muestras normales y patológicas, fueron añadidos a un calibrador con un valor elevado y a un calibrador con un valor bajo. Ninguna reacción cruzada fue observada con estas concentraciones.

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
1	1/1	-	28,6
	1/2	14,3	14,2
	1/4	7,1	7,1
	1/8	3,6	3,4
	1/16	1,8	1,4
2	1/1	-	30,8
	1/2	15,4	15
	1/4	7,7	7,7
	1/8	3,8	3,7

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	OST añadido (ng/ml)	OST Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
Suero	1,4	1,56	111
	4,04	4	99
	8,4	8,3	99
	15	14,5	97
	31	31	100
	64,6	64,4	100

E. Efecto "hook"

Una muestra con niveles de OST hasta 625 ng/ml presenta cuentas más elevadas que el último punto de calibración.

XIII. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas. Controles que contienen azida interfieren con la reacción enzimática y no pueden ser utilizados.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.
- Recomendamos que los controles sean probados como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo tiene que ser controlado con cartas de control de calidad de los controles.
- Recomendamos un control visual de la curva seleccionada por el ordenador.

XIV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de orientación; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Valores normales se encuentran entre 5 y 25 ng/ml.

XV. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar contacto de la piel con los reactivos, la Solución de Parada contiene HCl, la solución cromógena contiene TMB y H₂O₂. En caso de contacto, lavar con abundante agua.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

Para más información, consulte la MSDS.

XVI. BIBLIOGRAFIA

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
 The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
 Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
 Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
 Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
5. L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
 Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
 Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings".
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 - 5) Muestras, controles Conjugado de trabajo anti- OST-HRP	25 - 100	- 25 100
Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 µl de la Solución de Lavado y aspirar.		
Solución cromógena	100	100
Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente		
Solución de Parada	100	100
Leer con un lector de placa de microvaloración y verificar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (contra 630 o 650 nm).		

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

hOST-ELISA

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Ensaio imunoenzimático para determinação quantitativa *in vitro* da osteocalcina intacta (OST) humana no soro.

II. INFORMAÇÃO GERAL

- A. **Nome do proprietário** DIAsource hOST-ELISA Kit
- B. **Nº de catálogo :** KAP1381 : 96 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para assistência técnica ou encomendas, contacte:
Tel : +32 (0)10 84 99 11 - Fax : +32 (0)10 84 99 90

III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA





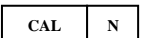
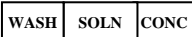
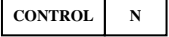
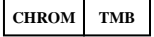
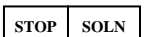
- A. **Actividades biológicas**
A osteocalcina ou proteína GLA (B.G.P) é a principal proteína não-colagénica da matriz óssea. Possui um peso molecular de 5800 Da e contém 49 aminoácidos, incluindo 3 resíduos de ácido glutâmico carboxil gama. A osteocalcina é sintetizada no osso pelos osteoblastos. Após a produção, é parcialmente incorporada na matriz do osso, encontrando-se o restante na circulação sanguínea. A função fisiológica exacta da osteocalcina mantém-se desconhecida. Um vasto número de estudos demonstrou que os níveis de circulação de osteocalcina reflectem a taxa de formação do osso.
- B. **Aplicação clínica**
A determinação dos níveis sanguíneos de osteocalcina é importante para:
- . A identificação de mulheres em risco de desenvolverem osteoporose
 - . A monitorização do metabolismo ósseo durante a perimenopausa e a pós-menopausa
 - . A monitorização do metabolismo ósseo durante a terapia de substituição hormonal e o tratamento de mulheres em pré-menopausa com agonistas LH-RH.
 - . A monitorização do metabolismo ósseo em pacientes com deficiência da hormona de crescimento, hipotiróidismo, hipertiróidismo e insuficiência renal crónica.

IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O DIAsource hOST-ELISA é um Imunoensaio de Sensibilidade Amplificada de Enzima de base sólida, realizado em placas de micro titulação destacáveis. O ensaio utiliza anticorpos monoclonais (AMbs) específicos para determinantes antigénicos distintos de osteocalcina humana. Os calibradores e amostras reagem com o anticorpo monoclonal de captura (AMB 1) revestido em poço de micro titulação e com um anticorpo monoclonal (AMB 2) rotulado com peroxidase de armário (PA). Após um período incubatório que permite a formação de uma sanduíche: AMB 1 revestido – osteocalcina humana – AMB 2 – PA, a placa de micro titulação é lavada para remover a parte livre do anticorpo rotulado enzimaticamente. O anticorpo ligado rotulado enzimaticamente é avaliado através de uma reacção cromogénica. A solução cromogénica (TMB pronta a utilizar) é adicionada e incubada. A reacção é interrompida com a adição de uma Solução de Paragem e, a seguir, a placa de micro titulação é lida no comprimento de onda apropriado. A quantidade de substrato turnover é determinada colorimetricamente, medindo a sua absorção, proporcional à concentração de osteocalcina.

A curva de calibração é traçada e a concentração de OST nas amostras é determinada por interpolação através da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 testes	Código de cor	Reconstituição
 Placa de micro titulação com poços removíveis revestidos anti OST 96 (Anticorpos monoclonais)	96 poços	azul	Pronto a utilizar
 Tampão Conjugado: tampão TRIS-HCl com soro bovino albumina, caseína bovina, EDTA, gentamicina e timol	1 recipiente 12 ml	vermelho	Pronto a utilizar
 Conjugação: Anti-OST rotulada com PA (Anticorpos monoclonais) em Tampão de estabilização	1 recipiente 0,4 ml	amarelo	Dilua 50 x com tampão conjugado
 Calibrador Zero em plasma humano com benzamidina e inibidores de protease	1 recipiente liofilizado	amarelo	Adicione 1 ml de água destilada
 Calibrador - N = 1 a 5 (ver valores exactos nos rótulos dos recipientes) em plasma humano sem osteocalcina com benzamidina e inibidores de protease	5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 1 ml de água destilada
 Solução de lavagem (Tris-HCl)	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 200 x com água destilada (use um agitador magnético).
 Controlos - N = 1 ou 2 Em plasma humano com timol, benzamidina e inibidores de protease	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 1 ml de água destilada
 Solução Cromogénica TMB (Tetrametilbenzidina)	1 recipiente 12 ml	preto	Pronto a utilizar
 Solução de Paragem: HCl 1N	1 recipiente 12 ml	branco	Pronto a utilizar

Note: 1. Use o Calibrador Zero para diluições da Amostra.

2. O calibrador DIAsource OST é calibrado num peptídeo sintético (Península 6045).

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não é fornecido com o kit:

1. Água destilada de elevada qualidade
2. Trasylo® a 10000IU/ml
3. Pipetas automáticas de: 25 µl, 100 µl, 500 µl e 1 ml (recomenda-se o uso de pipetas adequadas com pontas descartáveis)
4. Misturador vortex
5. Agitador magnético
6. Lavador de Placas de micro titulação
7. Leitor de Placas de micro titulação capaz de ler a 450 nm e 650 nm (em leituras bicromáticas)

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Calibradores** : Reconstitua o calibrador zero e outros calibradores com 1 ml de água destilada.
- Controlos** : Reconstitua os controlos com 1 ml de água destilada.
- Conjugado anti-OST-HRP functionante**: Prepare um volume adequado de solução conjugado adicionando 40µl de conjugado concentrado anti-OST-HRP para 2 ml de tampão de conjugado. Use um vortex para homogeneizar. A diluição extemporânea está recomendada
- Solução de Lavagem de Trabalho**: Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho ao adicionar 199 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (200x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução de lavagem não utilizada no final do dia.

VIII. CONSERVAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2-8°C.
- Poços não utilizadas devem ser guardadas a temperaturas entre 2-8°C, num saco selado contendo um dessecante, até à sua data de validade ser ultrapassada.
- Após reconstituição, os calibradores e controlos são muito instáveis, pelo que deverão ser usados imediatamente após a reconstituição. Para períodos de conservação mais longa, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por um período máximo de 6 semanas. A congelação deverá ser imediatamente realizada após a utilização. Não espere para congelar até todas as amostras estarem pipetadas.
- A Solução de Lavagem concentrada é estável à temperatura ambiente até que a sua data de validade seja ultrapassada.
- A Solução de Lavagem de Trabalho recentemente preparada deve ser utilizada no mesmo dia.
- Após a 1ª utilização, o conjugado concentrado é estável até ao final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original bem fechado, entre 2 e 8°C
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Recolha o sangue por venipunctura, tomando cuidado para evitar a hemólise. As amostras devem ser mantidas num banho de gelo. Separe o soro das células no prazo de 3 horas. Recomenda-se a utilização de centrifugação refrigerada. Adicione 100 µl de Trasylo® (10000IU/ml) ao soro imediatamente após a centrifugação (para obter 1000 IU de Trasylo® por ml de amostra). Com este tratamento, as amostras ficam estáveis durante 3 dias a 2-8°C. Para um período mais alargado, as amostras devem ser congeladas (-20°C). No entanto, as amostras só podem ser descongeladas uma vez! Para repetir o teste, descongele as amostras em alíquotas e elimine cada amostra após a primeira descongelação.
- Não use amostras hemolizadas ou amostras lipémicas.

X. PROCEDIMENTO

- Notas de manipulação**
Não utilize o kit ou os seus componentes após a expiração do prazo de validade.
Não misture componentes de lotes diferentes.
Antes de utilizar, todos os reagentes devem estar à temp. ambiente.
Misture completamente os reagentes e as amostras com agitação ou rotação suaves.

Realize calibradores, controlos e amostras em duplicado. É recomendado um alinhamento vertical.

Utilize um contentor limpo de plástico para preparar a Solução de Lavagem.

Para evitar contaminações cruzadas, use uma pipeta com ponta descartável para a adição de cada reagente e amostra.

Quando dispensar a Solução Cromogénica e a Solução de Paragem evite utilizar pipetas com partes em metal.

As pipetas de precisão elevada ou a pipetagem automática vão aumentar a precisão.

Respeite os tempos de incubação.

Para evitar variações, o tempo que mediar a pipetagem do primeiro calibrador e da última amostra deverá ser limitado àquele mencionado na secção XIII parágrafo E (Intervalo de tempo).

Prepare uma curva padrão para cada análise e não utilize dados de análises anteriores.

Dispense a Solução Cromogénica quando tiverem decorrido 15 minutos após a lavagem das placas de micro titulação.

Durante a incubação com a Solução Cromogénica, evite o contacto directo da luz solar com a placa de micro titulação.

B. Procedimento

1. Retire o número de poços que irá necessitar para a utilização que vai realizar. Os poços que não forem utilizadas deverão ser colocadas no saco com um dessecante e armazenadas a uma temperatura entre 2-8°C.
2. Guarde os poços no interior do seu invólucro.
3. Verta com a pipeta 25 µl de cada Calibrador, Controlador e Amostra no interior dos poços apropriados para cada um deles.
4. Verta com a pipeta 100 µl de conjugado de trabalho anti-OST-PA em todos os poços.
5. Incube durante 2 horas à temperatura ambiente
6. Aspire o líquido de cada um dos poços.
7. Lave a placa 3 vezes do seguinte modo:
 - dispense 0.4 ml de Solução de Lavagem no interior de cada poço
 - aspire o conteúdo de cada poço
8. Verta com a pipeta 100 µl de solução Cromogénica em cada um dos poços quando tiverem decorrido 15 minutos após os procedimentos de lavagem.
9. Incube as placas de micro titulação na horizontal durante 30 minutos à temperatura ambiente, evite a exposição à luz solar directa.
10. Verta com a pipeta 100 µl de Solução de Paragem em cada poço.
11. Leia as absorções a 450 nm (filtro de referência 630 nm ou 650 nm) durante 1 hora e calcule os resultados tal com está descrito na secção XI.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Leia a placa a 450 nm contra um filtro de referência regulado a 650 nm (ou 630 nm).
2. Calcule a forma de duplicar determinações.
3. Assinale os valores de OD (ordenada) para cada calibrador e as correspondentes concentrações de OST (abscissa) e desenhe uma curva de calibração.
4. Leia a concentração de cada controlo e amostra por interpolação da curva de calibração.
5. A redução de dados assistida por computador irá simplificar estes cálculos. Se for utilizado o processamento automático dos resultados, é recomendada a utilização de um formato em curva para uma função logística de 4 parâmetros.

Se for adicionado Trasytol® às amostras (100 µl/ml), os valores da amostra têm de ser multiplicados por 1.1.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas como exemplo e nunca devem ser utilizados em vez da curva de calibração executada em tempo real.

hOST-ELISA		Unidades OD
Calibradore	0,0 ng/ml	0,033
	1,56 ng/ml	0,118
	4,1 ng/ml	0,229
	12,7 ng/ml	0,641
	31,5 ng/ml	1,420
	75 ng/ml	2,415

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite da detecção

Os calibradores de vinte zeros foram testados em simultâneo com um conjunto de outros calibradores. O limite de detecção, definido como a concentração aparente dois desvios padrão acima do OD médio a compulsão zero, foi de 0.08 ng/ml.

B. Especificidade

Este método detecta osteocalcina humana intacta. Os fragmentos terminal-N e terminal-N foram adicionados a um calibrador de baixo e alto valor, nas suas máximas concentrações encontradas em amostras normais e patológicas. Nenhuma reactividade cruzada foi observada nestas concentrações.

C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

DP : Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	OST Adicionado (ng/ml)	OST Recuperado (ng/ml)	Recuperação (%)
Soro	1.4	1.56	111
	4.04	4	99
	8.4	8.3	99
	15	14.5	97
	31	31	100
	64.6	64.4	100

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico. (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)
1	1/1	-	28,6
	1/2	14,3	14,2
	1/4	7,1	7,1
	1/8	3,6	3,4
	1/16	1,8	1,4
2	1/1	-	30,8
	1/2	15,4	15
	1/4	7,7	7,7
	1/8	3,8	3,7

As amostras foram diluídas com Calibrador Zero.

E. Efeito "Hook"

Uma amostra com OST até 625 ng/ml apresenta contagens superiores ao último ponto de calibração.

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controlo 1 e/ou 2 não se situarem dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser usados sem uma explicação satisfatória para a discrepância verificada.
- Se necessário, cada laboratório pode fazer os seus pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas na forma de alíquotas congeladas. Os controlos, como contêm azida, interferem directamente com as reacções enzimáticas e, por isso, não podem ser utilizados.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas Laboratoriais.
- É recomendado que os Controlos sejam rotineiramente testados, como se de amostras desconhecidas se tratasse, para avaliar a variabilidade do teste. O desempenho do teste deverá ser monitorizado com gráficos de controlo de qualidade dos controladores.
- É boa prática a verificação visual do formato da curva seleccionado pelo computador.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas a título de referência. Cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio intervalo normal de valores.

Valores obtidos em indivíduos saudáveis, variando de 5 a 25 ng/ml.

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

O material de origem humana utilizado na preparação do reagente foi testado e considerado não reactivo ao antígeno de superfície da Hepatite B (HBs Ag), aos anticorpos do vírus da Hepatite C (HCV) e aos anticorpos do vírus da Imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2). Dado que nenhum método de ensaio conhecido pode oferecer a segurança completa da ausência de agentes infecciosos, manusear os reagentes e as amostras dos doentes como potencialmente infecciosos.

Todos os produtos animais e derivados foram recolhidos a partir de animais saudáveis. Os componentes bovinos são oriundos de países onde não foram notificados casos de BSE. No entanto, os componentes com substâncias animais devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto de qualquer superfície da pele com quaisquer reagentes. A Solução de Paragem contém HCl, o a solução cromogénica contém TMB e H₂O₂. Se ocorrer qualquer tipo de contacto, lave abundantemente a superfície exposta com água.

Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete pela boca. Use vestuário de protecção e luvas descartáveis.

Para mais informações, consulte o MSDS.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
5. L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	AMOSTRA(S) CONTROLOS (µl)
Calibradores (0-5) Amostras, Controlos Conjugado de trabajo Anti- OST-PA	25 - 100	- 25 100
Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente Aspirar o conteúdo de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 µl de Solução de Lavagem e aspirar.		
Solução Cromogénica	100	100
Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.		
Solução de Paragem	100	100
Ler no leitor de placas de micro titulação e registar a absorvência de cada poço a 450 nm (contra 630 ou 650 nm)		

CE

pl

Przed użyciem przeczytać cały protokół.

hOST-ELISA

I. PRZEZNACZENIE

Test immunoenzymatyczny *in vitro* przeznaczony do ilościowego oznaczania poziomu nienaruszonej ludzkiej osteokalcyny (OST) w surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa zastrzeżona:** DIAsource hOST-ELISA
- B. Numer katalogowy:** KAP1381 : 96 oznaczeń
- C. Producent:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Pomoc techniczna lub informacje dotyczące zamówień:
Tel.: +32 (0)10 84.99.11 Faks: +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Osteokalcyna, zwana także białkiem kostnym Gla (B.G.P), jest jednym z podstawowych białek niekolagenowych matrycy kości. Jest to białko o masie cząsteczkowej 5800 Da, zawierające 49 aminokwasów, w tym 3 reszty kwasu gamma-karboksyglutaminowego. Osteokalcyna jest wytwarzana w kościach przez osteoblasty. Wytworzona osteokalcyna jest częściowo włączana w matrycę kości, a pozostała część trafia do krwioobiegu. Funkcja fizjologiczna osteokalcyny nie została jak dotąd dokładnie poznana. Wiele badań świadczy o tym, że stężenia osteokalcyny w krwioobiegu odzwierciedlają wartość wskaźnika kostnienia.

B. Zastosowanie kliniczne

Oznaczenia poziomów osteokalcyny we krwi można wykonywać w celu:

- identyfikacji kobiet, u których występuje ryzyko osteoporozy;
- monitoringu metabolizmu kostnego w okresie perimenopauzy i postmenopauzy;
- monitoringu metabolizmu kostnego podczas hormonalnej terapii zastępczej oraz w trakcie leczenia agonistami LH-RH kobiet w okresie przedmenopauzalnym;
- monitoringu metabolizmu kostnego u pacjentów z niedoborem hormonu wzrostu, niedoczynnością tarczycy, nadczynnością tarczycy, przewlekłą niewydolnością nerek.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

DIASource hOST-ELISA jest przeprowadzany w fazie stałej oznaczeniem immunoenzymatycznym z amplifikacją czułości, wykonywanym na odłamywanych mikropłytkach. W teście wykorzystywane są przeciwciała monoklonalne (MAbs), skierowane przeciwko różnym epitomom ludzkiej osteokalcyny. Kalibratory i próbki reagują z wychwytyjącym przeciwciałem monoklonalnym (MAB 1), którym pokryta jest mikrostudzienka, oraz z przeciwciałem monoklonalnym znakowanym peroksydazą chrzanową (HRP). Po okresie inkubacji tworzy się kompleks w postaci kanapki: opłaszczony MAB 1 – ludzka osteokalcyna - MAB 2 - HRP. Mikropłytkę przemywa się w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała znakowanego enzymem. Związane przeciwciała znakowane enzymem jest mierzone za pośrednictwem reakcji chromogennej. Następnie dodaje się roztwór chromogeny (gotowy do użycia roztwór TMB) i przeprowadza się inkubację. Reakcję zatrzymuje się przez dodanie roztworu hamującego reakcję, a następnie mikropłytkę odczytuje się przy odpowiedniej długości fali. Ilość związanego substratu oznacza się kolorymetrycznie poprzez pomiar absorbancji, której wartość jest proporcjonalna do stężenia osteokalcyny. Wykreślana jest krzywa kalibracji, a stężenie OST w próbkach określa się przez interpolację z krzywej kalibracji.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZANE W ZESTAWIE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstrukcja
Mikropłytki z 96 odłamywanymi studzienkami pokrytymi przeciwciałami anti-OST (przeciwciała monoklonalne)	96 studzienek	niebieski	Gotowy do użycia
Bufor koniugatu: Bufor TRIS-HCl z albuminą surowicy bydlęcej, kazeiną bydlęcą, EDTA, gentamycyną i tymolem	1 fiolka 12 ml	czerwony	Gotowy do użycia
Koniugat: anti-OST znakowane HRP (przeciwciała monoklonalne) w buforze stabilizującym	1 fiolka 0,4 ml	żółty	Rozcieńczyć 50x buforem koniugatu
Kalibrator zerowy w plazma ludzkiej z inhibitorami proteazy i benzamidyną	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	Dodać 1 ml destylowanej wody
Kalibrator N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w plazma ludzkiej z inhibitorami proteazy i benzamidyną	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	Dodać 1 ml destylowanej wody
Roztwór płuczący (Tris-HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 200x destylowaną wodą (użyć mieszała magnetycznego)
Kontrole N = od 1 do 2 w plazma ludzkiej z inhibitorami proteazy, benzamidyną i tymolem	2 fiolek materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 1 ml destylowanej wody
CHROM TMB Chromogeny roztwór TMB (tetrametylobenzydyna)	1 fiolka 12 ml	czarny	Gotowy do użycia
STOP SOLN Roztwór hamujący reakcję: HCl 1N	1 fiolka 12 ml	biały	Gotowy do użycia

Uwaga: 1. Do rozcieńczania próbek stosować kalibrator zerowy.

2. Kalibrator DIASource OST jest kalibrowany na peptydzie syntetycznym (Peninsula 6045).

VI. NIEZBĘDNE MATERIAŁY DOSTARCZANE ODDZIELNIE

Niezbędne materiały niedołączone do zestawu:

1. Wysokiej jakości woda destylowana
2. Trasyloł®, 10000IU/ml
3. Pipety do dozowania: 25 µl, 100 µl, 500 µl i 1 ml (zaleca się stosowanie dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
4. Mieszadło wirowe (vortex)
5. Mieszadło magnetyczne
6. Przemycarka dla mikropłytek
7. Czytnik mikropłytek z możliwością odczytu w pasmach 450 nm i 650 nm (odczyt bichromatyczny)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rekonstruować kalibrator zerowy i inne kalibratory 1 ml wody destylowanej.
- B. Kontrole:** Rekonstruować kontrole 1 ml wody destylowanej.
- C. Roboczy roztwór koniugatu anti-OST-HRP:** Przygotować odpowiednią objętość roztworu koniugatu poprzez dodanie 40 µl stężonego koniugatu anti-OST-HRP do 2 ml buforu koniugatu. Homogenizować roztwór mieszałem wirowym. Zalecane jest doraźne przygotowywanie roztworu.
- D. Roboczy roztwór płuczący:** Przygotować odpowiednią objętość roboczego roztworu płuczającego, dodając 199 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (200x). Homogenizować roztwór mieszałem magnetycznym. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności podanej na etykiecie fiolek, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Niezużyte studzienki należy przechowywać do upływu daty ważności w temperaturze 2-8°C, w szczelnym woreczku z substancją osuszającą.
- Po rekonstrukcji kalibratory i kontrole są bardzo niestabilne, należy je zużyć niezwłocznie po rekonstrukcji. W celu dłuższego przechowywania alikwoty należy przygotować, a następnie przechowywać w temp. - 20°C przez maksymalnie 6 tygodni. Należy je zamrozić bezpośrednio do zastosowania, nie czekając do zakończenia pipetowania wszystkich próbek. Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.
- Stężony roztwór płuczający jest stabilny w temperaturze pokojowej do upływu daty ważności.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający należy zużyć w tym samym dniu.
- Po pierwszym wykorzystaniu skoncentrowany koniugat jest stabilny do upływu daty ważności pod warunkiem, że jest przechowywany w oryginalnej, szczelnie zamkniętej fiolece w temp. 2 - 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO OZNACZEŃ

- Pobrać próbki krwi poprzez wkłucie dożylnie, nie dopuścić do hemolizy. Probki muszą być zanurzone w lodowo-wodnej kąpeli. Surowicę od komórek oddzielić w ciągu 3 godzin poprzez wirowanie, w miarę możliwości w schłodzonej wirówce. Bezpośrednio po wirowaniu do surowicy dodać 100 µl trasylołu (Trasyloł®, 10000IU/ml), aby uzyskać 1000 IU trasylołu na 1 ml próbki. Przygotowane w ten sposób próbki są stabilne przez 3 dni w temp. 2-8°C. W celu dłuższego przechowywania próbki należy zamrozić (- 20°C), jednak po pierwszym rozmrożeniu nie można ich ponownie zamrażać! W celu przeprowadzenia wielokrotnych oznaczeń próbki należy zamrozić w alikwotach, a następnie każdą próbkę usuwać po pierwszym rozmrożeniu.
- Nie stosować próbek hemolizowanych ani lipemicznych.

X. PROCEDURA

A. Wskazówki dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie podanej daty ważności.

Nie mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów.

Przed wykonaniem oznaczeń wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.

Kalibratory, kontrole i próbki oznaczać podwójnie. Zalecane jest ustawienie pionowe.

Roztwór płuczący przygotować w czystym, plastikowym pojemniku.

Roztworu chromogennego i roztworu hamującego reakcję nie należy odmierzать pipetami z metalowymi końcówkami.

Oznaczenia będą dokładniejsze, jeżeli zostaną wykonane pipetami

wysokiej precyzji lub pipetami automatycznymi.

Należy przestrzegać czasów inkubacji.

Aby uniknąć zjawiska dryfu parametrów, czas pomiędzy odmierzeniem pipetą pierwszego kalibratora i ostatniej próbki nie może przekroczyć 30 minut.

Przygotować krzywą kalibracji dla każdego cyklu pomiarowego, nie można korzystać z danych z poprzednich oznaczeń.

Odmierzyć roztwór chromogeny w czasie 15 minut od momentu

przemycia mikroplastyki.

Podczas inkubacji roztworu chromogennego należy unikać narażania mikroplastyki na bezpośrednie nasłonecznienie.

B. Procedura

- Wybrać docelową liczbę studzienek do oznaczania. Nieużyte studzienki należy ponownie umieścić w szczelnie zamkniętym woreczku ze środkiem osuszającym i przechowywać w temp. 2-8°C.
- Umieścić studzienki w oprawie.
- Odmierzyć pipetą 25 µl każdego z kalibratorów, kontroli i próbki do odpowiednich studzienek.
- Odmierzyć pipetą do wszystkich studzienek po 100 µl roboczego roztworu koniugatu anty-OST-HRP.
- Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.
- Zaaspirować płyn z każdej studzienki.
- Trzykrotnie przepłukać płytkę:
 - odmierzyc do każdej studzienki po 0,4 ml roztworu płuczącego;
 - zaaspirować zawartość każdej studzienki.
- W czasie 15 minut od momentu zakończenia przepłukiwania, odmierzyc do każdej studzienki po 100 µl roztworu chromogennego.
- Inkubować mikroplastykę w pozycji poziomej przez 30 minut w temperaturze pokojowej; chronić przed bezpośrednim nasłonecznieniem.
- Do wszystkich studzienek odmierzyc pipetą po 100 µl roztworu hamującego reakcję.
- W czasie 1 godziny odczytać absorbancje przy 450 nm (filtr referencyjny 630 nm lub 650 nm) i wyliczyć wyniki w sposób opisany w sekcji XI.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- Odczytać płytkę przy 450 nm z użyciem filtra referencyjnego ustawionego na 650 nm (lub 630 nm).
- Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- wykreślić wartości gęstości optycznej (OD) (rzędna) dla każdego kalibratora względem odpowiednich stężeń OST (odcięta), narysować krzywą kalibracji.
- Odczytać stężenie każdej kontroli i próbki poprzez interpolację krzywej kalibracji.
- Krzywą kalibracji można opracować metodą wspomagania komputerowego. W razie automatycznego przetwarzania wyników zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej czteroparametrowej.

Jeżeli do próbek dodano trasyolol (100 µl/ml), wartości próbek należy pomnożyć przez 1,1.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie jako przykład i nie należy ich stosować w miejsce rzeczywistych krzywych kalibracji.

hOST-ELISA		Jednostki OD
Kalibrator	0,0 ng/ml	0,033
	1,56 ng/ml	0,118
	4,1 ng/ml	0,229
	12,7 ng/ml	0,641
	31,5 ng/ml	1,420
	75 ng/ml	2,415

XIII. WYNIKI I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywalności

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywalności, definiowana jako wyraźne stężenie dwóch odchyleń standardowych powyżej średniej

Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego poszczególne odczynniki i próbki należy dodawać czystymi końcówkami jednorazowych pipet.

wartości OD przy wiązaniu zerowym, kształtowała się na poziomie 0,08 ng/ml.

B. Swoistość

Metoda służy do wykrywania nienaruszonej ludzkiej osteokalcyny.

Badano maksymalne stężenia N-końcowych i C-końcowych fragmentów w próbkach normalnych i patologicznych, a następnie dodawano do kalibratorów o niskiej i wysokiej wartości. Nie zaobserwowano żadnej reaktywności krzyżowej w badanych stężeniach.

C. Precyzja

WEWNĄTRZSERYJNA				MIĘDZYSERYJNA			
Surowica	N	<X>±SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X>±SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	11.5 ± 0.5	4.6	A	20	11.9 ± 0.4	3.4
B	20	28.2 ± 0.9	3.0	B	20	27.7 ± 1.5	5.5

SD: standardowe odchylenie, CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

Próbka	Dodana OST (ng/ml)	Odzyskana OST (ng/ml)	Odzysk (%)
Surowica	1.4	1.56	111
	4.04	4	99
	8.4	8.3	99
	15	14.5	97
	31	31	100
	64.6	64.4	100

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stężenie teoretyczne (ng/ml)	Stężenie mierzone (ng/ml)
1	1/1		28,6
	1/2	14,3	14,2
	1/4	7,1	7,1
	1/8	3,6	3,4
	1/16	1,8	1,4
2	1/1		30,8
	1/2	15,4	15
	1/4	7,7	7,7
	1/8	3,8	3,7

Próbki rozcieńczono przy zastosowaniu kalibratora zerowego.

E. Efekt haka (hook effect)

Próbka zawierająca OST w oznaczonym stężeniu na poziomie 625 ng/ml daje wyższe OD niż ostatni punkt kalibracji.

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie mieszczą się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane, dopóki nie uda się znaleźć zadowalającego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Każde laboratorium może wedle własnego uznania wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Kontrole zawierające azydek interferujący z reakcją enzymatyczną i nie mogą być stosowane.
- Kryteria dopuszczalności dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z dobrą praktyką laboratoryjną.
- Zaleca się, aby w celu określenia zmienności oznaczenia rutynowo oznaczać kontrole jako nieznanne próbki. Wyniki oznaczeń należy monitorować przy użyciu arkuszy kontroli jakości kontroli.
- Dobrą praktyką jest wzrokowe sprawdzanie dopasowania krzywej wybranej przez komputer.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Niniejsze wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne. Przewidywany zakres normalnych wartości wynosi od 5 do 25 ng/ml.

XVI. UWAGI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Produkt przeznaczony wyłącznie do celów diagnostycznych w warunkach in vitro.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zatwierdzonymi przez UE i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Z tego względu postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego zostały pobrane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Niemniej jednak składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego należy uznać za potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu odczynników ze skórą. Roztwór hamujący reakcję zawiera HCl, roztwór chromogeny zawiera TMB i H₂O₂. W razie kontaktu należy dokładnie przemyć miejsce zanieczyszczenia wodą.

Nie palić tytoniu, nie pić napojów, nie spożywać posiłków ani nie nakładać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Nosić odzież ochronną i jednorazowe rękawice.

Więcej informacji można znaleźć w karcie MSDS.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19,1984)
"Serum BGP: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MA SHIT ER and al. (1988)
"Osteocalcin: a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S, MTNISOLA andal. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism: short-term effect of surgery".
Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207
5. L.A COILTON, C.J. PRESTON and at. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin: Diagnostic Methods and Clinical Applications".
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLOT and al. (1992)
"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometry findings".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	KALIBRATORY (µl)	PRÓBKA(-I) KONTROLE (µl)
Kalibratory (0-5) Próbka, kontrole Roboczy roztwór koniugatu anty-OST-HRP	25 - 100	- 25 100
Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Zaaspirować zawartość każdej studzienki. Przepłukać trzykrotnie 400 µl roztworu płuczającego i zaaspirować.		
Roztwór chromogeny	100	100
Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.		
Roztwór hamujący reakcję	100	100
Odczytać na czytniku mikroplitek i zarejestrować absorbancję każdej studzienki przy 450 nm (względem 630 lub 650 nm).		