

Instructions for Use

Osteocalcin ELISA

IVD



REF EIA-3375

Σ 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	3
2	CLINICAL BACKGROUND	3
3	PRINCIPLES OF THE METHOD	3
4	REAGENTS PROVIDED.....	4
5	SUPPLIES NOT PROVIDED	4
6	REAGENT PREPARATION	4
7	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS	5
8	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
9	PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11	TYPICAL DATA.....	6
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	7
13	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	8
14	REFERENCE INTERVALS	8
15	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
16	SUMMARY OF THE PROTOCOL.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	KLINISCHER HINTERGRUND	9
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	9
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	10
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	10
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	10
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....	11
8	PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG	11
9	DURCHFÜHRUNG	11
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
11	TYPISCHE WERTE	12
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	13
13	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	14
14	REFERENZ INTERVALLE	14
15	VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN	14
16	ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS.....	14

1	USO DEL KIT	15
2	INFORMAZIONI CLINICHE	15
3	PRINCIPIO DEL METODO	15
4	REATTIVI FORNITI.....	16
5	REATTIVI NON FORNITI.....	16
6	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	16
7	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI	17
8	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	17
9	METODO DEL DOSAGGIO	17
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	18
11	CARATTERISTICHE TIPICHE.....	18
12	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO.....	19
13	CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO	20
14	INTERVALLI DI RIFERIMENTO.....	20
15	PRECAUZIONI PER L'USO.....	20
16	SCHEMA DEL DOSAGGIO	20
1	INSTRUCCIONES DE USO.....	21
2	INFORMACIÓN CLÍNICA.....	21
3	PRINCIPIOS DEL MÉTODO.....	21
4	REACTIVOS SUMINISTRADOS.....	22
5	MATERIAL NO SUMINISTRADO.....	22
6	PREPARACIÓN REACTIVOS.....	22
7	ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS	23
8	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	23
9	PROTOCOLO	23
10	CALCULO DE RESULTADOS	24
11	EJEMPLO DE RESULTADOS	24
12	REALIZACIÓN Y LIMITACIONES.....	24
13	CONTROL DE CALIDAD INTERNO	25
14	INTERVALOS DE REFERENCIA.....	25
15	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	25
16	RESUMEN DEL PROTOCOLO.....	25
1	UTILISATION PRÉVUE	26
2	CONTEXTE CLINIQUE	26
3	PRINCIPES DE LA MÉTHODE.....	26
4	RÉACTIFS FOURNIS	27
5	MATÉRIEL NON FOURNI.....	27
6	PRÉPARATION DES RÉACTIFS.....	27
7	CONSERVATION ET DATES D'EXPIRATION DES RÉACTIFS	28
8	RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	28
9	PROCÉDURE	28
10	CALCUL DES RÉSULTATS.....	29
11	TYPICAL DATA.....	29
12	PERFORMANCE ET LIMITES.....	30
13	CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE	31
14	INTERVALLES DE RÉFÉRENCE	31
15	PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE	31
16	RÉSUMÉ DU PROTOCOLE	31
17	BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	32
	SYMBOLS USED.....	33

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 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.

2.2 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.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The Osteocalcin 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.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	96 tests Kit	Reconstitution
MICROTITERPLATE	Microtiter plate with 96 anti OST (monoclonal antibodies) coated breakable wells	96 wells	Ready for use
CONJ BUF	Conjugate buffer: TRIS-HCl buffer with bovine serum albumin, bovine casein, EDTA, gentamycin and thymol	1 vial 12 mL	Ready for use
Ab HRP CONC	Conjugate: HRP labelled anti-OST (monoclonal antibodies) in Stabilizing Buffer	1 vial 0.4 mL	Dilute 50 x with conjugate buffer
CAL 0	Zero calibrator in human plasma with protease inhibitors and benzamidine	1 vial lyophilized	Add 1.0 mL distilled water
CAL N	Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with protease inhibitors and benzamidine	5 vials lyophilized	Add 1.0 mL distilled water
WASH SOLN CONC	Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Controls - N = 1 or 2 in human plasma with protease inhibitors, benzamidine and thymol	2 vials lyophilized	Add 1.0 mL distilled water
CHROM TMB	Chromogenic TMB Solution (tetramethylbenzidine)	1 vial 12 mL	Ready for use
STOP SOLN	Stop Solution: HCl 1N	1 vial 12 mL	Ready for use

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
2. The OST calibrator is calibrated on a synthetic peptide (Peninsula 6045).

5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. High quality distilled water
2. Trasylol® at 10000 IU/mL
3. Pipettes for delivery of: 25 µL, 100 µL, 500 µL and 1 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
4. Vortex mixer
5. Magnetic stirrer
6. Washer for Microtiter plates
7. Microtiter plate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

6 REAGENT PREPARATION**A. Calibrators:**

Reconstitute the zero calibrator and other calibrators with 1.0 mL distilled water.

B. Controls:

Reconstitute the controls with 1.0 mL distilled water.

C. 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.

D. 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.

7 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 °C to 8 °C.

Unused wells must be stored, at 2 °C to 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 °C to 8 °C.

Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 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 Trasylol® (10000IU/mL) to the serum immediately after centrifugation (to obtain 1000 IU Trasylol® per mL sample).

With this treatment the samples are stable for 3 days at 2 °C to 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.

9 PROCEDURE

9.1 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.

9.2 Procedure

1. 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 °C to 8 °C
2. Secure the wells into the holding frame.
3. Pipette 25 µL of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 100 µL of working anti-OST-HRP conjugate into all the wells.
5. Incubate for 2 hours at room temperature.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
Dispensing 0.4 mL of Wash Solution into each well
Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µL of the chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature horizontal and avoid direct sunlight.
10. Pipette 100 µL of Stop Solution into each well.
11. Read the absorbance at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section 10.

10 CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. Plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of OST (abscissa) and draw a calibration curve.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. 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.

11 TYPICAL DATA

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

Osteocalcin 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

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 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.

12.2 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.

12.3 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	5.4

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 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	-
1/2		15.4	15
1/4		7.7	7.7
1/8		3.8	3.7

Samples were diluted with zero calibrator.

12.5 Hook effect

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

13 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.

14 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.

15 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 SDS.

16 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 μ L 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)		

1 VERWENDUNGSZWECK

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

2 KLINISCHER HINTERGRUND

2.1 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.

2.2 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.

3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der Osteocalcin ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay 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 enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (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.

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
MICROTITERPLATE	Mikrotiterplatte mit 96 anti-OST beschichtete brechbare Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	gebrauchsfertig
CONJ BUF	Konjugat-Puffer: TRIS-HCl-Puffer mit Rinderserumalbumin, Rindercasein, EDTA, Gentamycin und Thymol	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig
Ab HRP CONC	Konjugat: MRP-beschriftete Anti-OST (monoklonale Antikörper) in Stabilisierungspuffer	1 Gefäß 0,4 mL	50 x mit Konjugat Puffer verdünnen
CAL 0	Null-Kalibrator in Humanplasma mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	1 Gefäß lyophilisiert	1,0 mL dest. Wasser zugeben
CAL N	Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	5 Gefäße lyophilisiert	1,0 mL dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC	Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 mL	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N	Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mit Benzamidin, Proteaseinhibitoren und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	1,0 mL dest. Wasser zugeben
CHROM TMB	Farblösung TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig
STOP SOLN	Stopplösung: HCL, 1N	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig

- Bemerkung:**
1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
 2. Der OST-Kalibrator wird auf ein synthetisches Peptid kalibriert (Peninsula 6045).

5 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)

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**A. Kalibratoren:**

Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator und die anderen Kalibratoren mit 1.0 mL dest. Wasser.

B. Kontrollen:

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1,0 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.

7 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 °C 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 °C bis 8 °C bis zum Ablaufdatum stabil.

Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

8 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 °C - 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!

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 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.

9.2 Durchführung

1. 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 °C bis 8 °C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Wells im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 25 µL Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
4. Pipettieren Sie 100 µL gebrauchsfertiges Anti-OST-HRP Konjugat in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunde bei Raumtemperatur
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7. Waschen Sie die Platte dreimal:
pipettieren Sie 0,4 mL Waschlösung in jedes Well
saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
8. Pipettieren Sie 100 µL der Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jedes Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
10. Pipettieren Sie 100 µL der Stopplösung in jedes Well.
11. 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 10 beschrieben.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie die OD-Werte für jeden Kalibrator gegen die entsprechende PTH-Konzentration (Abszisse) auf und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. 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.

11 TYPISCHE WERTE

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

Osteocalcin 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

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

12.1 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.

12.2 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.

12.3 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

12.4 Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zuggeg. 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. Konzentr. (ng/mL)	Gemess. Konzentr. (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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

12.5 Hook-Effekt

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

13 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.

14 REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Normale Werte sind zwischen 5 bis 25 ng/mL zu erwarten.

15 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.

16 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (μL)	PROBE(N) KONTROLLEN (μL)
Kalibratoren (0-5)	25	-
Proben, Kontrollen	-	25
gebrauchsfertiges Anti-OST-MRP Konjugat	100	100
2 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 μ L 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 (gegen 630 oder 650 nm) vermerken.		

1 USO DEL KIT

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

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 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.

2.2 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.

3 PRINCIPIO DEL METODO

Osteocalcin 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

4 REATTIVI FORNITI

	Reattivi	96 test	Volume di ricostituzione
MICROTITER PLATE	Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili rivestiti anti OST (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso
CONJ BUF	Tampone del coniugato : TRIS-HCl con BSA, caseina bovina, EDTA, gentamicina e timolo	1 flacone 12 mL	Pronto per l'uso
Ab HRP CONC	Coniugato: marcato HRP anti-OST (Anticorpi monoclonali) in Tampone Stabilizzante	1 flacone 0,4 mL	Diluire 50 x con Tampone del Coniugato
CAL 0	Calibratore zero in plasma umano contenente benzamidina e inibitori della proteasi	1 flacone liofiliz.	Aggiungere 1,0 mL di acqua distillata
CAL N	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.	Aggiungere 1,0 mL di acqua distillata
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 mL	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N	Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano contenente benzamidina, inibitori della proteasi e timolo	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1,0 mL di acqua distillata
CHROM TMB	Soluzione TMB cromogena (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 mL	Pronto per l'uso
STOP SOLN	Soluzione di arresto: HCL 1N	1 flacone 12 mL	Pronto per l'uso

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

5 REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Trasyol® a 10000 IU/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)

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:**
Ricostituire lo calibratore zero e gli altri calibratore con 1,0 mL di acqua distillata.
- B. Controlli:**
Ricostituire i controlli con 1,0 mL di acqua distillata.
- C. Coniugato anti-OST-HRP attivo:**
Preparare la quantità necessaria di soluzione del coniugato aggiungendo 40 µL 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.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.

I pozzetti inutilizzate devono essere conservate a 2 °C - 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 °C - 8 °C nel flacone originale ben tappato.

Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8 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 Trasylol® (10000 IU/mL) al siero immediatamente dopo la centrifugazione (per ottenere 1000 IU Trasylol® per mL di campione).

Con questo trattamento i campioni sono stabili per 3 giorni a 2 °C - 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.

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 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.

9.2 Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di pozzetti necessario per il test. I pozzetti inutilizzati devono essere risigillati nel contenitore con un essiccante e conservati a 2 °C - 8 °C
2. Assicurare i pozzetti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 25 µL di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 100 µL della soluzione di lavoro del coniugato anti-OST-HRP in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
versando 0,4 mL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µL di soluzione di rivelazione preparata al momento in ogni pozzetto entro 15 minuti dalla fase di lavaggio.
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente in posizione orizzontale; evitare la luce diretta del sole.
10. Pipettare 100 µL di reagente d'arresto in ogni pozzetto.
11. 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 10.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di OST.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. 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.

11 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.

Osteocalcin 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

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 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.

12.2 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.

12.3 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

12.4 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

12.5 Effetto hook

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

13 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 azide 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.

14 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).

15 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 la scheda di dati di sicurezza (SDS).

16 SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (μL)	CAMPIONI CONTROLLI (μL)
Calibratore (0 - 5)	25	-
Campioni, controlli	-	25
Soluzione di lavoro del Coniugato anti-OST-HRP	100	100
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μ L 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)		

1 INSTRUCCIONES DE USO

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

2 INFORMACIÓN CLÍNICA

2.1 Actividades biológicas

La osteocalcina o Gla proteina 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.

2.2 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

3 PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El Osteocalcin 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.

4 REACTIVOS SUMINISTRADOS

	Reactivos	96 tests Kit	Reconstitución
MICROTITERPLATE	Placa de microvaloración con anti OST (anticuerpos monoclonales) pocillos recubiertos rompibles	96 pocillos	Listo para uso
CONJ BUF	Tampón de Conjugado: tampón TRIS-HCl con albúmina bovina, caseína bovina, EDTA, gentamicina y thymol.	1 vial 12 mL	Listo para uso
Ab HRP CONC	Conjugado: anti OST marcado con HRP (anticuerpos monoclonales) en Tampón Estabilizante.	1 vial 0,4 mL	Diluir 50 x con tampón de conjugado
CAL 0	Calibrador cero en plasma humano con benzamidina y inhibidores de proteasa	1 vial lío filizados	Añadir 1 mL de agua destilada
CAL N	Calibradores N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en plasma humano con benzamidina y inhibidores de proteasa	5 vial lío filizados	Añadir 1,0 mL de agua destilada
WASH SOLN CONC	Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	Diluir 200 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N	Controles - N = 1 o 2 en plasma humano, benzamidina, inhibidores de proteasa y thymol.	2 vial Lío filizados	Añadir 1,0 mL de agua destilada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB (Tetrametilbenzidina)	1 vial 12 mL	Listo para uso
STOP SOLN	Solución de Parada: HCl 1N	1 vial 12 mL	Listo para uso

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

5 MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Trasylol® a 10000 UI/mL
3. Pipetas de 25 µL, 100 µL, 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)

6 PREPARACIÓN REACTIVOS**A. Calibradores:**

Reconstituir el calibrador cero y otros calibradores con 1,0 mL de agua destilada.

B. Controles:

Reconstituir los controles con 1,0 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 homogeneizar. 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.

7 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 °C - 8 °C.

Los pocillos que no han sido usados deben ser almacenados entre 2 °C - 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 °C - 8 °C.

Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

8 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 Trasylol® (10000 IU/mL) al suero inmediatamente después de la centrifugación (para obtener 1000 IU de Trasylol® al mL de muestra).

Con este tratamiento las muestras están estables durante 3 días a 2 °C - 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.

9 PROTOCOLO

9.1 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 municiosamente 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.

9.2 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 °C - 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 10.

10 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 los valores OD (ordenada) para cada calibrador contra la concentración de OST 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 Trasylol® es añadido a las muestras (100 µL/mL), los valores de las muestras se deben multiplicar por 1,1.

11 EJEMPLO DE RESULTADOS

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

Osteocalcin 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

12 REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

12.1 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.

12.2 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.

12.3 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

12.4 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
	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

12.5 Efecto "hook"

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

13 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.

14 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.

15 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 ficha de datos de seguridad (SDS).

16 RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µL)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µL)
Calibradores (0 - 5)	25	-
Muestras, controles	-	25
Conjugado de trabajo anti-OST-HRP	100	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).		

1 UTILISATION PRÉVUE

Dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative in vitro de l'ostéocalcine (OST) humaine intacte dans le sérum.

2 CONTEXTE CLINIQUE

2.1 Activités biologiques

L'ostéocalcine ou la GLA-protéine osseuse (B.G.P) est la protéine non collagène principale de la matrice osseuse. Elle a un poids moléculaire de 5 800 Da et contient 49 acides aminés, comprenant 3 résidus d'acide gamma-carboxyglutamique. L'ostéocalcine est synthétisée dans l'os par les ostéoblastes. Une fois synthétisée, une partie de l'ostéocalcine est intégrée à la matrice osseuse tandis que l'autre partie se retrouve dans la circulation sanguine. La fonction physiologique exacte de l'ostéocalcine reste incertaine. De nombreuses études montrent que les concentrations d'ostéocalcine dans la circulation sanguine illustrent le taux de formation osseuse.

2.2 Application clinique

La détermination des taux d'ostéocalcine dans le sang est utile pour:

L'identification des femmes à risque d'ostéoporose

La surveillance du métabolisme osseux pendant la période précédant la ménopause et pendant la ménopause

La surveillance du métabolisme osseux pendant une hormonothérapie substitutive et pendant un traitement par agonistes de la LH-RH chez les femmes en préménopause

La surveillance du métabolisme osseux chez les patients présentant un déficit en hormone de croissance ou atteints d'hypothyroïdie, d'hyperthyroïdie ou d'insuffisance rénale chronique

3 PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test DIASource hOST-ELISA est un dosage immunoenzymatique de sensibilité amplifié en phase solide réalisé sur des microplaques sécables. Le test utilise des anticorps monoclonaux (MAb) dirigés contre des épitopes spécifiques de l'ostéocalcine humaine. Les étalons et les échantillons réagissent avec l'anticorps monoclonal de capture (MAb 1) qui recouvre le puits de la microplaque et avec un anticorps monoclonal (MAb 2) marqué à la peroxydase de raifort (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich : MAb 1 – ostéocalcine humaine – MAb 2 – HRP, la microplaque est lavée afin de retirer tous les anticorps marqués à l'enzyme et non liés. Les anticorps marqués à l'enzyme et liés sont mesurés par réaction chromogène. La solution chromogène (solution chromogène à la TMB prête à l'emploi) est ajoutée et le mélange est incubé. La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt et la microplaque est ensuite lue à la longueur d'onde appropriée. Le degré de conversion du substrat est déterminé par colorimétrie en mesurant l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en ostéocalcine.

Une courbe d'étalonnage est tracée et la concentration en OST dans les échantillons est déterminée par interpolation à partir de la courbe d'étalonnage.

4 RÉACTIFS FOURNIS

	Réactifs	Trousse de 96 tests	Reconstitution
MICROTITERPLATE	Microplaque avec 96 puits sécables recouverts d'anticorps anti-OST (anticorps monoclonaux)	96 wells	Prêt à l'emploi
CONJ BUF	Tampon de conjugué : tampon de TRIS-HCl avec de l'albumine sérique bovine, de la caséine bovine, de l'EDTA, de la gentamicine et du thymol	1 vial 12 mL	Prêt à l'emploi
Ab HRP CONC	Conjugué : anticorps anti-OST (anticorps monoclonaux) marqués à l'HRP dans le tampon de stabilisation	1 vial 0.4 mL	Diluer 50 x avec le tampon de conjugué
CAL 0	Étalon zéro dans du plasma humain avec des inhibiteurs de la protéase et de la benzamidine	1 vial lyophilized	Ajouter 1 ml d'eau distillée
CAL N	Étalon, N = 1 à 5 (Voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon) dans du plasma humain avec des inhibiteurs de la protéase et de la benzamidine	5 vials lyophilized	Ajouter 1 ml d'eau distillée
WASH SOLN CONC	Solution de lavage (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un mélangeur magnétique).
CONTROL N	Contrôles, N = 1 ou 2 dans du plasma humain avec des inhibiteurs de la protéase, de la benzamidine et du thymol	2 vials lyophilized	Ajouter 1 ml d'eau distillée
CHROM TMB	Solution chromogène à la TMB (tétraméthylbenzidine)	1 vial 12 mL	Prêt à l'emploi
STOP SOLN	Solution d'arrêt : HCl 1 N	1 vial 12 mL	Prêt à l'emploi

- Remarque:**
1. Utiliser l'étalon zéro pour les dilutions d'échantillons.
 2. L'étalon DIASource OST est étalonné sur un peptide synthétique (Peninsula 6045).

5 MATÉRIEL NON FOURNI

1. Le matériel mentionné ci-dessous est requis, mais non fourni avec la trousse :
2. Eau distillée de qualité supérieure
3. Trasylo® à 10 000 UI/ml
4. Pipettes pour : mesurer 25 µl, 100 µl, 500 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises avec des embouts en plastique jetables est recommandée)
5. Agitateur vortex
6. Mélangeur magnétique
7. Système de lavage pour microplaques
8. Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

6 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. Étalons:** reconstituer l'étalon zéro et les autres étalons avec 1 ml d'eau distillée
- B. Contrôles:** reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
- C. Conjugué anti-OST-HRP de travail:** préparer un volume adéquat de solution de conjugué en ajoutant 40 µl du conjugué anti-OST-HRP concentré à 2 ml du tampon de conjugué. Utiliser un vortex pour homogénéiser la solution. Une préparation extemporanée est recommandée.
- D. Solution de lavage de travail:** préparer un volume adéquat de solution de lavage de travail en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de solution de lavage (200 x). Utiliser un mélangeur magnétique pour homogénéiser. Jeter toute solution de lavage de travail non utilisée à la fin de la journée.

7 CONSERVATION ET DATES D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

Avant ouverture ou reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à leur date d'expiration (mentionnée sur l'étiquette du flacon) s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C.

Les puits non utilisés doivent être conservés dans un sac scellé avec un dessicant, à une température comprise entre 2 et 8 °C, jusqu'à la date d'expiration.

Après la reconstitution, les étalons et les contrôles sont très instables. Ils doivent donc être utilisés immédiatement après la reconstitution. Pour de plus longues périodes de conservation, des aliquots doivent être réalisés et conservés à -20 °C pendant un maximum de 6 mois. Congeler immédiatement après utilisation. Ne pas attendre que tous les échantillons soient pipetés pour les congeler. Éviter tout cycle ultérieur de congélation-décongélation.

La solution de lavage concentrée est stable à température ambiante jusqu'à la date d'expiration.

La solution de lavage de travail doit être utilisée le jour où elle est préparée.

Après sa première utilisation, le conjugué concentré est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est conservé entre 2 et 8 °C dans le flacon d'origine bien fermé.

Des altérations de l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

8 RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Prélever le sang par ponction veineuse en prenant soin d'éviter l'hémolyse. Conserver les échantillons dans un bain de glace. Séparer le sérum des cellules dans les 3 heures qui suivent. Il est recommandé d'utiliser une centrifugeuse réfrigérée. Ajouter 100 µl de Trasylol® (10 000 UI/ml) au sérum immédiatement après la centrifugation (pour obtenir 1 000 UI de Trasylol® par ml d'échantillon).

Avec ce traitement, les échantillons sont stables pendant 3 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour des périodes de conservation plus longues, les échantillons doivent être congelés (-20 °C). Cependant, il n'est possible de décongeler les échantillons qu'une seule fois ! Pour répéter les tests, congeler les échantillons en aliquots et jeter chaque échantillon après la première décongélation.

Ne pas utiliser d'échantillons lipidiques ou hémolysés.

9 PROCÉDURE

9.1 Remarques concernant la manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants au-delà de la date d'expiration.

Ne pas mélanger de matériel provenant de trousse de lots différents.

Amener tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Bien mélanger tous les réactifs et les échantillons en agitant ou en tournant doucement.

Doser les étalons, contrôles et échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la solution de lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser un nouvel embout de pipette jetable pour l'ajout de chaque réactif et échantillon.

Pour la distribution de la solution chromogène et de la solution d'arrêt, éviter d'utiliser des pipettes contenant des parties métalliques.

Des pipettes de grande précision ou un équipement de pipetage automatisé améliorent la précision.

Respecter les durées d'incubation.

Pour éviter toute dérive, le délai entre le pipetage du premier étalon et celui du dernier échantillon ne doit pas dépasser 30 minutes.

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque test ; ne pas utiliser les données des tests précédents.

Distribuer la solution chromogène dans les 15 minutes suivant le lavage de la microplaque.

Pendant l'incubation avec la solution chromogène, éviter toute exposition de la microplaque à la lumière directe du soleil.

9.2 Procédure

1. Sélectionner le nombre de puits requis pour le test. Les puits non utilisés doivent être replacés dans le sac bien fermé avec un dessiccant et conservés à une température comprise entre 2 à 8 °C.
2. Fixer solidement les puits dans le support.
3. Pipeter 25 µl de chaque étalon, contrôle et échantillon dans les puits appropriés.
4. Pipeter 100 µl du conjugué d'anti-OST-HRP de travail dans tous les puits.
5. Incuber pendant 2 heures à température ambiante.
6. Aspirer le liquide de chaque puits.
7. Laver la plaque 3 fois en:
versant 0,4 ml de solution de lavage dans chaque puits
aspirant le contenu de chaque puits
8. Pipeter 100 µl de solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes qui suivent l'étape de lavage.
9. Laisser incuber la microplaque à l'horizontale pendant 30 minutes à température ambiante et éviter l'exposition à la lumière directe.
10. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
11. Lire les valeurs d'absorbance à 450 nm (filtre de référence à 630 nm ou 650 nm) dans l'heure qui suit, et calculer les résultats comme décrit à la section 10.

10 CALCUL DES RÉSULTATS

1. Lire la plaque à 450 nm par rapport au filtre de référence paramétré à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne des déterminations réalisées en double.
3. Reporter les valeurs de densité optique (DO, ordonnées) pour chaque étalon en fonction de la concentration correspondante en OST (abscisse) et tracer la courbe d'étalonnage.
4. Lire la concentration de chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe d'étalonnage.
5. Un programme informatique de réduction de données simplifiera ces calculs. Si un traitement automatique des résultats est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction de lissage de courbes à « 4 paramètres ».

Si Trasylo® est ajouté aux échantillons (100 µl/ml), les valeurs des échantillons doivent être multipliées par 1,1.

11 TYPICAL DATA

Les données suivantes sont fournies uniquement à titre d'illustration et ne devront jamais être utilisées à la place de la courbe d'étalonnage en temps réel.

	Osteocalcin ELISA	Unités de DO
Étalon	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

12 PERFORMANCE ET LIMITES

12.1 Limite de détection

Vingt étalons zéro ont été évalués avec un groupe d'autres étalons. La limite de détection, définie comme la concentration apparente à deux écarts-types au-dessus de la DO moyenne à la liaison zéro, était de 0,08 ng/ml.

12.2 Spécificité

Cette méthode détecte l'ostéocalcine humaine intacte. Les fragments N-terminal et C-terminal ont été testés à leurs niveaux maximums trouvés dans des échantillons normaux et pathologiques, et ont été ajoutés à un étalon de faible valeur et à un étalon de valeur élevée. Aucune réaction croisée n'a été observée à ces concentrations.

12.3 Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± ET (ng/mL)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± ET (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	5.4

E-T: écart-type ; CV: coefficient de variation

12.4 Exactitude

TEST DE RÉCUPÉRATION

Échantillon	OST ajoutée (ng/ml)	OST récupérée (ng/ml)	Récupération (%)
Sérum	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

TEST DE DILUTION

Échantillon	Dilution	Conc. théorique (ng/ml)	Conc. mesurée (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

Les échantillons ont été dilués avec l'étalon zéro.

12.5 Effet crochet

Un échantillon dopé à l'OST jusqu'à 625 ng/ml donne des valeurs de DO supérieures à celles du dernier point d'étalon.

13 CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Si les résultats obtenus pour le contrôle 1 et/ou le contrôle 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de l'écart.

Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés sous forme d'aliqots. Les contrôles contenant des azides ne peuvent pas être utilisés car ils interfèrent avec la réaction enzymatique.

Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en doublet des échantillons doivent être basés sur les bonnes pratiques de laboratoire

Il est recommandé de tester fréquemment les contrôles comme des échantillons inconnus afin de mesurer la variabilité des tests. La réalisation du test doit être surveillée par des tableaux de contrôle qualité des contrôles.

La vérification visuelle du lissage de courbe choisi par l'ordinateur fait partie des bonnes pratiques.

14 INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Les valeurs sont données uniquement à titre indicatif; chaque laboratoire doit établir son intervalle de valeurs normales. Des valeurs normales sont attendues entre 5 et 25 ng/ml.

15 PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Sécurité

Pour diagnostic in vitro uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans cette trousse ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et se sont avérés négatifs au test de dépistage de l'HBsAg, l'anti-VHC, l'anti-VIH-1 et l'anti-VIH-2. Aucune méthode connue ne permet de garantir à 100 % que les dérivés de sang humain ne transmettront pas l'hépatite, le SIDA ou d'autres infections. Par conséquent, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été prélevés sur des animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Éviter tout contact des réactifs avec la peau. La solution d'arrêt contient de l'HCl. La solution chromogène contient de la TMB et de l'H₂O₂. En cas de contact, rincer abondamment à l'eau.

Ne pas fumer, boire, manger, ni appliquer de produits cosmétiques dans la zone de travail. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements de protection et des gants jetables.

Pour plus d'information, consulter la FDS.











16 RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	ÉTALONS (µl)	ÉCHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Étalons (0-5) Échantillons, contrôles Conjugué anti-OST-HRP de travail	25 - 100	- 25 100
Incuber pendant 2 heures à température ambiante. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de solution de lavage et aspirer.		
Solution chromogène	100	100
Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de microplaques et consigner l'absorbance de chaque puits à 450 nm (par rapport à 630 ou 650 nm).		

17 BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA / LITERATUR / 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. 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.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Catalogue number	Katalognummer	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
LOT	Batch code	Chargenbezeichnung	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit	Temperaturgrenzwerte	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date	Verwendbar bis	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer	Hersteller	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur
	Date of manufacture	Herstellungsdatum	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production
	Biological risks	Biologische Risiken	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution	Achtung	Attenzione	Precaución	Attention
UDI	Unique device Identifier	eindeutige Produktidentifizierung			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité