



hOST-IRMA

KIP1381

Read entire protocol before use.

hOST-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative measurement of human intact osteocalcin (OST) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource hOST-IRMA Kit
- B. Catalog number :** KIP1381 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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 DIAsource hOST-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mabs1, the capture antibodies, are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mabs1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. The use of several distinct Mabs avoids hyperspecificity, common to two-site IRMA.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti OST (monoclonal antibodies)	2 x 48	brown	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled anti-OST (monoclonal antibodies) in TRIS buffer with bovine serum albumin, azide (<0.1%), EDTA, protease inhibitors and an inert red dye	Ab	¹²⁵ I	1 vial 5.5 ml 440 kBq	red	Ready for use	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero calibrator in osteocalcin free human serum with benzamidine and protease inhibitors	CAL	0	1 vial lyophil.	yellow	Add 1.0 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in osteocalcin free human serum with benzamidine and protease inhibitors	CAL	N	5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls 1 and 2 in human serum with thymol, benzamidine and protease inhibitors	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note:

- Use the zero calibrator for sample dilutions.
- The origin of the osteocalcin for the preparation of the calibrators is human.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Trasylol® at 10000IU/ml
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Tube shaker (400 rpm)
- Magnetic stirrer
- Refrigerated centrifuge
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 1.0 ml distilled water and other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). 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 kit components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- 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°. Freezing should be performed immediately after use, do not wait for freezing until all the samples are pipetted.
Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer 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

- Serum or heparin and EDTA plasma provide similar results.
- Collect blood by venipuncture, taking care to avoid hemolysis, the samples must be kept in an ice bath. Separate the plasma or serum from the cells within 3 hours, the use of a refrigerated centrifuge is recommended. Add 100 µl Trasylol® (10000IU/ml) to the plasma or serum immediately after centrifugation (to obtain 1000 IU Trasylol® 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 citrate plasma, hemolyzed samples or lipemic samples.

X. PROCEDURE

A. 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. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
- Briefly vortex calibrators, controls, samples and dispense 50 µl of each into the respective tubes.
- Dispense 50 µl of anti-OST- ^{125}I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a tube shaker (400 rpm)
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
- Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
- After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of OST (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
- 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 to be 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-IRMA			cpm	B/T (%)
Total count			160142	100
Calibrator	0.0	ng/ml	197	0.12
	1.9	ng/ml	2050	1.27
	4.5	ng/ml	5467	3.40
	19.5	ng/ml	26254	16.31
	46.0	ng/ml	60957	37.86
	69.0	ng/ml	86764	53.89

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

- A. Detection limit**

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 0.22 ng/ml.
- B. Specificity**

This method detects intact human osteocalcin. N-terminal and C-terminal fragments, 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.

added Hormone	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
N-terminal fragment 1-18 at 28 mM	18.5	125
C-terminal fragment at 5.5 mM	19.2	97

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	Replicate	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	Replicate	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	2.99 ± 0.06	2.0	A	10	9.03 ± 0.54	5.9
B	10	8.60 ± 0.08	1.0	B	10	20.1 ± 0.4	4.2
C	10	20.0 ± 0.2	1.0				

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST		
Added OST (ng/ml)	Recovered OST (ng/ml)	Recovery (%)
7.5	7.6	101
15.0	14.6	97
30.0	32.9	109
60.0	73.3	122

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
A	1/1	-	60.5
	1/2	30.3	29.0
	1/4	15.1	12.7
	1/8	7.6	6.7
	1/16	3.8	3.6
	1/32	1.9	2.0

Samples were diluted with zero calibrator.

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

- E. Time delay between last calibrator and sample dispensing**

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY				
Sample	0'	10'	20'	30'
X	3.4	3.3	3.3	3.4
Y	8.8	9.1	8.8	8.7
Z	20.5	20.8	20.4	20.8

- F. Hook-effect**

A sample spiked with OST up to 1000 ng/ml gives higher counts 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.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.
Healthy subjects obtained values ranging from 5 to 25 ng/ml (2.5 to 97.5 percentiles).

Pathology	nr. of subjects	X ± SD ng/ml
Healthy subjects	61	13.7 ± 5.5
Premenopausal women	19	10.6 ± 3.1
Postmenopausal women	25	15.6 ± 5.9
patients with tumor-induced hypercalcemia	29	13.0 ± 12.0
patients with hyperparathyroidism	14	31.6 ± 14.7
patients with hypoparathyroidism	18	5.1 ± 3.2

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

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 reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

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

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.
9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin.
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
Calibrators (0-5) Samples, Controls Tracer	- - 0.05	0.05 - 0.05	- 0.05 0.05
Incubation	2 hours at room temperature with shaking (400 rpm)		
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIASource Catalogue Nr : KIP1381	P.I. Number : 1700521/en	Revision Number: 090422/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Revision date : 2009-04-22

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hOST-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'ostéocalcine intacte (OST) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource hOST-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP1381 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

L'ostéocalcine ou la GLA protéine osseuse (B.G.P) est la protéine non-collagène principale de la moëlle osseuse. Elle a un poids moléculaire de 5800 Da et contient 49 acides aminés, comprenant 3 résidus gamma carboxy-acide glutamique. L'ostéocalcine est synthétisée dans l'os par les ostéoblastes. Après la production, elle est en partie incorporée dans la moëlle osseuse et le reste se trouve dans la circulation sanguine. La fonction physiologique exacte de l'ostéocalcine est encore peu claire. Un grand nombre d'études prouvent que les concentrations circulantes de l'ostéocalcine reflètent le taux de formation d'os.

B. Applications cliniques

La détermination du taux sanguin en ostéocalcine est utile pour :

- . L'identification des femmes risquant de développer de l'ostéoporose.
- . Suivre le métabolisme osseux pendant la peri-ménopause et la post-ménopause.
- . Suivre le métabolisme osseux pendant une thérapie de remplacement hormonal et le traitement des femmes en pré-ménopause avec des agonistes LH-RH.
- . Suivre le métabolisme osseux chez les patients avec déficience en hormone de croissance, hypothyroïdie, hyperthyroïdie, insuffisance rénale chronique.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIASource hOST-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L'addition de Mab2, l'anticorps signal marqué avec l'125I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène. L'utilisation de plusieurs Mabs différents évite l' hyperspécificité, commune aux IRMA deux-sites.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti OST (anticorps monoclonal)	2 x 48	Brun	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: anti - OST marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux) dans un tampon TRIS avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%), EDTA, inhibiteurs de protéase et un colorant rouge inactif	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 5,5 ml 440 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du sérum humain libre d'ostéocalcine avec de la benzamidine et des inhibiteurs de protéase	CAL	0	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain libre d'ostéocalcine avec de la benzamidine et des inhibiteurs de protéase	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec du thymol, de la benzamidine et des inhibiteurs de protéase	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note:

1.
- Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2.
- L'origine de l'ostéocalcine pour la préparation des calibrateurs est humaine.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1.
- Eau distillée
2.
- Trasylol® à 10000IU/ml
3.
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 500 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
4.
- Agitateur vortex
5.
- Agitateur de tubes (400 rpm)
6.
- Agitateur magnétique
7.
- Centrifugeuse réfrigérée
8.
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
9.
- Système d'aspiration (optionnel)
10.
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'125 peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A.
- Calibrateurs : Reconstituer le calibrateur zéro avec 1,0 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- B.
- Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C.
- Solution de Lavage : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

-
- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
-
- Après la reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont très instables, utiliser immédiatement après reconstitution. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à – 20°C. Congeler immédiatement après l'usage, ne pas attendre jusqu'à ce que tous les échantillons soient pipetés.
-
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
-
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
-
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

-
- Le sérum, le plasma hépariné ou le plasma traité avec l'EDTA donne des résultats similaires.
-
- Collecter le sang par vénipuncture, en évitant l'hémolyse, les échantillons doivent être gardés dans un bain de glace. Séparer le plasma ou le sérum des cellules dans les 3 heures, l'emploi d'une centrifugeuse réfrigérée est recommandé. Ajoutez 100 µl de Trasylol® (10000IU/ml) au plasma ou au sérum immédiatement après la centrifugation (pour obtenir 1000 IU de Trasylol® par ml d'échantillon). Avec ce traitement les échantillons sont stables pour 3 jours à 2-8°C. Pour une conservation plus longue, les échantillons doivent être congelés (- 20°C), bien que les échantillons ne puissent être décongelés qu'une fois ! Pour des tests répétés, congeler les échantillons aliquotés et jeter chaque échantillon après la première décongélation.
-
- Ne pas utiliser de plasma citrate et d'échantillons hémolysés ou lipémiques.

X. MODE OPERATOIRE

- A.
- Notes de manipulation
- Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

1.
- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, contrôle, échantillon. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d' anticorps.
2.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3.
- Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
4.
- Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
6.
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
8.
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).

9. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
11. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en OST (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. Si le Trasylol® est ajouté aux échantillons (100 µl/ml), multiplier les valeurs des échantillons par 1,1.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

hOST-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		160142	100
Calibrateur	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

- A. **Sensibilité**
Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,22 ng/ml.
- B. **Spécificité**
Cette méthode détecte l'ostéocalcine intacte humaine. Les fragments N-terminal et C-terminal, aux concentrations maximum trouvées dans des échantillons normaux et pathologiques, ont été ajoutés à un calibrateur de valeur haute et à un calibrateur de valeur basse. On n'a pas observé de réactivité croisée pour ces concentrations.

Hormone ajoutée	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
Fragment N-terminal 1-18 à 28 mM	18,5	125
Fragment C-terminal à 5,5 mM	19,2	97

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION		
OST ajoutée (ng/ml)	OST récupérée (ng/ml)	Récupération (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n'existe pour ce paramètre.

- E. **Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon**
Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELA				
Echantillon	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

- F. **Effet crochet**
Un échantillon dopé avec de l'OST jusqu'à 1000 ng/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 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 la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d’ information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.
Les sujets sains obtenaient des valeurs de 5 à 25 ng/ml (2,5 à 97,5 percentiles).

Pathologie	nb. de sujets	X ± SD ng/ml
Sujets sains	61	13,7 ± 5,5
Femmes en pré-ménopause	19	10,6 ± 3,1
Femmes en post-ménopause	25	15,6 ± 5,9
Patients avec hypercalcémie induisant une tumeur	29	13,0 ± 12,0
Patients avec hyperparathyroïdisme	14	31,6 ± 14,7
Patients avec hypoparathyroïdisme	18	5,1 ± 3,2

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de I¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV). Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l’achat, le stockage, l’utilisation et l’échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l’homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L’équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d’éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L’adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l’anti-HCV, l’anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l’assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d’hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.
Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d’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.
L’azide de sodium est nocif s’il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l’azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L’azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l’eau le matériel utilisé.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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.

9.

J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
"Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin".
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRA- TEURS (ml)	ECHANTIL- LON(S) CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-5) Echantillons, Contrôles Traceur	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Incubation	2 heures à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 Aspiration 2,0 aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1381	P.I. Number : 1700521/fr	Revision nr : 090422/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hOST-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem intaktem Osteocalcin (OST) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource hOST-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1381 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mabs1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mabs1. Zugabe von Mab2, des mit ¹²⁵I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder. Die Verwendung einiger unterschiedlicher Mabs vermeidet die sonst bei zweiseitigem IRMA auftretende Hyperspezifität.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution			
 Mit anti OST-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	braun	gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iodmarkierter Anti-OST (monoklonale Antikörper) in TRIS puffer mit Rinderserum-albumin, Azid (<0,1%), EDTA, Proteaseinhibitoren und inertem roten Farbstoff	Ab	¹²⁵ I	1 Gefäß 5,5 ml 440 kBq	rot	gebrauchsfertig	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null Kalibrator in Osteocalcin-freiem Humanserum mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	CAL	0	1 Gefäß lyophil.	gelb	1 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Osteocalcin-freiem Humanserum mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	CAL	N	5 Gefässe lyophil.	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 or 2 Humanserum mitThymol, Benzamidin und Proteaseinhibitoren	CONTROL	N	2 Gefässe lyophil.	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung:

- 1. Benutzen Sie Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
- 2. Das Osteocalcin für die Zubereitung der Kalibratoren ist menschlichen Ursprungs.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- 1. Dest. Wasser
- 2. Trasylol® (10.000 IE/ml)
- 3. Pipetten: 50 µl, 500 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- 4. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- 5. Schüttler für Röhrchen (400 rpm)
- 6. Absaugsystem (optional)
- 7. Vortex Mixer
- 8. Magnetrührer
- 9. Kühltzentrifuge
- 10. Jegl. Gamma-Counter, der 125I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren** : Rekonstituieren Sie den Null Kalibrator mit 1,0 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen** : Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.

- C. **Waschlösung**: Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- 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. Sofort nach Gebrauch einfrieren, mit dem Einfrieren nicht warten, bis alle Proben pipettiert sind.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer 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

- Serumproben, EDTA oder heparinisiertes Plasma liefern ähnliche Ergebnisse.
- Blutabnahme durchführen, dabei auf Vermeidung einer Hämolyse achten. Die Proben müssen in einem Eisbad gelagert werden. Plasma oder Serum sollten innerhalb von 3 Stunden von den Zellen separiert werden, die Nutzung einer Kühltzentrifuge ist ratsam. Unmittelbar nach der Zentrifugation sind dem Plasma bzw. 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.
- Zitratplasma, 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. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

- 1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- 2. Vortexen Sie Kalibratoren , Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 50 µl in ihre Röhrchen.
- 3. Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
- 4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
- 5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem schütteln (400 rpm).
- 6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- 7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- 8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
- 9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- 10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- 11. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- 1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- 2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration OST (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- 3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- 4. 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.
- 5. Wenn den Proben Trasylol® zugesetzt wird (100 µl/ml), müssen die Probenwerte 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-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		160142	100
Kalibrator	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

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 Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,22 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 Kreuz-Reaktivität festgestellt.

Zugeg. Hormon	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
N-terminales Fragment 1-18 bei 28 mM	18,5	125
C-terminales Fragment bei 5,5 mM	19,2	97

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST		
Zugeg. OST (ng/ml)	Wiedergef. OST (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (ng/ml)	Gemess. Konz. (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.

Laut unserem Wissen, gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

- E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**
Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND				
Probe	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

- F. Hookeffekt**
Eine Probe mit OST bis zu 1000 ng/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

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 Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Gesunde Personen erzielten Werte von 5 bis 25 ng/ml (2,5 bis 97,5 Perzentilen).

Pathologie	Anz. der Personen	X ± SD ng/ml
Gesunde Personen	61	13,7 ± 5,5
Prämenopausale Frauen	19	10,6 ± 3,1
Postmenopausale Frauen	25	15,6 ± 5,9
Patienten mit tumorinduzierter Hyperkalzämie	29	13,0 ± 12,0
Patienten mit Hyperparathyreoidismus	14	31,6 ± 14,7
Patienten mit Hypoparathyreoidismus	18	5,1 ± 3,2

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.
Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in 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 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 den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

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.

9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin.
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA- TOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Tracer	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Inkubation	2 Std. bei Raumtemperatur unter ständigem schütteln (400 rpm).		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DIAsource Katalognummer : KIP1381	Beipackzettelnnummer: 1700521/de	Nummer der Originalausgabe: 090422/1
--------------------------------------	-------------------------------------	--

Lees het hele protocol vóór gebruik.

hOST-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

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

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. Gedeponoerd handelsmerk: DIAsource hOST-IRMA kit

B. Catalogusnummer: KIP1381: 96 testen

C. Geproduceerd door: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)67 88 99 99 - Fax: +32 (0)67 88 99 96

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*

hOST-Irma van DIAsource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de buizen zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ¹²⁵I, zal het systeem vervollledigen en de immunologische reactie teweegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis , de antigeenconcentratie weer. Door het gebruik van meerdere verschillende Mabs wordt hyperspecificiteit vermeden, die gebruikelijk is voor IRMA met 2 Mabs.

V. *GELEVERDE REAGENTIA*

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 buizen gecoat met anti-OST (monoklonale antilichamen)	2 x 48	violet	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: Anti-OST (monoklonale antilichamen) gelabeld met ¹²⁵ jood in TRIS buffer met bovien serumalbumine, azide (< 0,1%) , EDTA, protease inhibitoren en een inerte rode kleurstof	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 5,5 ml 440 kBq	rood	Klaar voor gebruik	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator in osteocalcine-vrij humaan serum met benzamidine en protease inhibitoren	CAL	0	1 vial gevries- droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 tot 5 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in osteocalcine-vrij humaan serum met benzamidine en protease inhibitoren	CAL	N	5 flacons, gevries- droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 of 2 in humaan serum met thymol, benzamidine en protease inhibitoren	CONTROL	N	2 flacons, gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Opmerking:

1.

Gebruik Nulkalibrator voor monsterverdunningen

2.

De oorsprong van de osteocalcine voor de bereiding van de kalibrators is humaan.

VI. *NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN*

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

1.

Gedestilleerd water.

2.

Trasylol® bij 10000IU/ml

3.

Pipetten voor een volume van 50 µl, 500 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).

4.

Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.

5.

Schudder voor de buisjes (400 rpm)

6.

Afzuigsysteem (facultatief).

7.

Vortexmenger.

8.

Magnetische roerder.

9.

Gekoelde Centrifuge

10.

Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. *BEREIDING VAN HET REAGENS*

- A.

Kalibrators: Reconstitueer de nulkalibrator met 1,0 ml gedestilleerd water en de andere kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B.

Controles: Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C.

Werk-wasoplossing: Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 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.
-
- 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. Invriezen moet onmiddellijk na gebruik gebeuren, wacht niet met invriezen tot alle stalen gepipetteerd zijn.
-
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
-
- Na het eerste gebruik is de tracer 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*

-
- Serum en plasma (EDTA en heparine) leveren vergelijkbare resultaten op.
-
- Verzamel bloed door venepunctie; let erop hemolyse te vermijden; de monsters moeten in een ijsbad bewaard worden. Scheidt het plasma of serum van de cellen binnen 3 uur; het gebruik van een gekoelde centrifuge is aanbevolen. Voeg 100 µl Trasylol® (10000IU/ml) aan het plasma of serum toe onmiddellijk na het centrifugeren (om 1000 IU Trasylol® 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 stalen worden ingevroren (- 20°C), hoewel de monsters slechts één maal ontdooid kunnen worden! Bevries voor herhaalde bepaling de monsters in aliquots en dank elk monsters af na het eerste ontdooien.
-
- Gebruik geen citraat plasma, gehemolyseerde monsters of lipemische monsters.

X. *PROCEDURE*

- A.

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
1.

Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale s buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
2.

Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 50 µl van elk in de desbetreffende buis.
3.

Pipetteer 50 µl van de tracer in elke buis .
4.

Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
5.

Incubeer gedurende 2 uren uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (400 rpm).
6.

Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7.

Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.

8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
9. Was de buizen nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
10. Na de laatste wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten recht op blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op
11. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige OST -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
3. Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
4. Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Als Trasylol® 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-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		160142	100
Kalibrator	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

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 0,22 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.

Toegevoegd hormoon	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
N-terminaal fragment 1-18 bij 28 mM	18,5	125
C-terminaal fragment bij 5,5 mM	19,2	97

C. **Precisie**

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	VC (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. **Nauwkeurigheid**

RECOVERY –TEST		
Toegevoegd OST (ng/ml)	Recovery van OST (ng/ml)	Recovery (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

De monsters zijn verdund met Nulkalibrator.

Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

- F. **Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster**
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate tubes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE				
Monster	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

- G. **"Hook"-effect**
Een monster, dat met OST gespiket werd tot 1000 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.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

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).

Pathologie	aantal subjecten	X ± SD ng/ml
Gezonde subjecten	61	13,7 ± 5,5
Premenopausale vrouwen	19	10,6 ± 3,1
Postmenopausale vrouwen	25	15,6 ± 5,9
Patiënten met tumor-geïnduceerde hypercalciëmie	29	13,0 ± 12,0
Patiënten met hyperparathyroidisme	14	31,6 ± 14,7
Patiënten met hypoparathyroidisme	18	5,1 ± 3,2

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.
Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.
Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.
Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.
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 dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.
Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

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.

9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin.
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (ml)	KALIBRA- TORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -5) Monsters, Controles Tracer	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Incubatie	2 uren bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (400 rpm)		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1381	Nummer van de bijsluiter: 1700521/nl	Revisienummer: 090422/1
--	--	----------------------------

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

hOST-IRMA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource hOST-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1381: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

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

Il kit DAsource hOST-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Standard e campioni hanno dapprima una bassa affinità per i Mabs 1; l'aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con ¹²⁵I, provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di osteocalcina in standard e campioni. L'uso di alcuni anticorpi monoclonali diversi evita l'iperspecificità del dosaggio, frequente nei dosaggi IRMA a due siti..

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti OST (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Bruno	Pronte per l'uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcato: anti-OST (Anticorpi monoclonali) marcati con ¹²⁵ I in tampone TRIS con BSA, sodio azide (<0,1%), EDTA, inibitori della proteasi e un colorante inerte rosso	Ab	¹²⁵ I	1 flacone 5,5 ml 440 kBq	Rosso	Pronto per l'uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in siero umano senza osteocalcina contenente benzamidina e inibitori della proteasi	CAL	0	1 vial liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano senza osteocalcina contenente benzamidina e inibitori della proteasi	CAL	N	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano, contenente timolo, benzamidina e inibitori della proteasi.	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note:

1. Usare Calibratore zero per diluire i campioni.
2. L'origine dell'osteocalcina per la preparazione dei calibratori è quella umana.

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata.
2. Trasylol® a 10000IU/ml
3. Pipette per dispensare 50 µl, 500 µl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore rotante (400 rpm)
6. Agitatore magnetico.
7. Centrifuga refrigerata
8. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
9. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
10. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 1,0 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.

- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 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.
- § 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. Effettuare il congelamento immediatamente dopo l'uso, non attendere per il congelamento che tutti i campioni vengano pipettati.
- § 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 marcato 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

- § Il siero, il plasma da EDTA e il plasma eparina forniscono gli stessi valori
- § Raccogliere il sangue per venopuntura, prestando attenzione nell'evitare l'emolisi; mantenere i campioni in un bagno di ghiaccio. Separare il plasma o il siero dalle cellule entro 3 ore: si raccomanda l'uso di una centrifuga refrigerata. Aggiungere 100 µl Trasylol® (10000IU/ml) al plasma o 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 2-8°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 plasma citrato, 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. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. 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.

- B. **Metodo del dosaggio**
1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 50 µl di marcato in tutte le provette.
4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- 1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- 2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di OST. Scartare i risultati palesemente discordanti.
- 3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- 4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
- 5. Se viene aggiunto Trasylol® ai campioni (100 µl/ml), moltiplicare i valori per 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-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		160142	100
Calibratore	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

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 cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,22 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.

Ormone aggiunto	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
Frammento N-terminale 1-18 a 28 mM	18,5	125
Frammento C-terminale a 5,5 mM	19,2	97

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO		
OST aggiunta (ng/ml)	OST recuperata (ng/ml)	Recopero (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

TEST DI DILUZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

Al momento non risulta disponibile uno calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

- E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione**
Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO				
Campione	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

- E. Effetto hook**
Un campione ha cui è stata aggiunta OST fino a 1000 ng/ml ha cpm 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 criteri di accettazione per la differenza tra i risultati doppi dei campioni devono riflettere la Buona prassi di laboratorio

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).

Patologia	n. di soggetti	X ± SD ng/ml
soggetti sani	61	13,7 ± 5,5
donne in premenopausa	19	10,6 ± 3,1
donne in postmenopausa	25	15,6 ± 5,9
pazienti con ipercalcemia tumore-indotta	29	13,0 ± 12,0
pazienti con iperparatiroidismo	14	31,6 ± 14,7
pazienti con ipoparatiroidismo	18	5,1 ± 3,2

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.
L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. 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 ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

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. 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.

9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin.
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale	Calibratore	Campioni Controlli
	ml	ml	ml
Calibratore (0 to 5)	-	50	-
Campioni, controlli	-	-	50
Marcato	50	50	50
Incubazione	2 ore a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).		
Separazione	-	Aspirare	
Soluzione di lavoro	-	2 ml	
tampone di lavaggio			
Separazione	-	Aspirare	
Soluzione di lavoro	-	2 ml	
tampone di lavaggio			
Separazione	-	Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIASource : KIP1381	P.I. numero : 1700521/it	Revisione numero : 090422/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Leer el protocolo completo antes de usar.

hOST-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource hOST-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1381 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

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

hOST-Irma de DIAsource es un radioinmunoensayo basado en la separación en tubos recubiertos de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, adheridos a la parte interior de las paredes del tubo de poliestireno. Al principio calibradores o muestras añadidos en los tubos presentarán poca afinidad con Mabs1. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ¹²⁵I, completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno. El uso de varios Mabs distintos evita hiperespecificidad, propia de los IRMA de dos-puntos.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti OST (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	marrón	Listo para uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRAZADOR: anti-OST(anticuerpos monoclonales) marcado con I125 en tampón TRIS con albúmina bovina, azida (<0,1%), EDTA, inhibidores de proteasa y un colorante rojo inerte	Ab	¹²⁵ I	1 vial 5,5 ml 440 kBq	rojo	Listo para uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador cero en suero humano libre de osteocalcina con benzamidina y inhibidores de proteasa	CAL	0	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano libre de osteocalcina con benzamidina y inhibidores de proteasa	CAL	N	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en suero humano, thymol, benzamidina y inhibidores de proteasa	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CONTROL	N					

Nota:

- Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
- El origen de la osteocalcina para la preparación de los calibradores es humano.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

- Agua destilada
- Trasylol® a 10000UI/ml
- Pipetas de 50µl, 500µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
- Vortex
- Agitador de tubos (400 rpm)
- Agitador magnético
- Centrifuga refrigerada
- Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 1,0 ml de agua destilada y otros calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). 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.
- 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. Congelar inmediatamente después del uso, no esperar a que todas las muestras sean preparadas
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador 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

- Suero, plasma en EDTA o plasma en heparina presentan resultados similares.
- Recoger la sangre por venipunción,, evitando la hemólisis, las muestras se deben guardar en un baño de hielo. Separar el plasma o el suero de las células en menos de 3 horas, se recomienda el uso de una centrifugada refrigerada. Añadir 100 µl de Trasylol® (10000IU/ml) al plasma o 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 2-8°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 plasma citrato y 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 numero 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**
 - Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 - Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispensar 50 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos destinados a las Cuentas Totales.
 - Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
 - Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
 - Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de las Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 - Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.

- Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de las Cuentas Totales)
- Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
- Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante..
- Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

- Calcular la media de los duplicados.
- Representar en un gráfico semilogarítmico o linear las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de OST (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos obtenidos, rechazando los duplicados malos
- Leer la concentración de cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
- Métodos computarizados de proceso de resultados pueden ser utilizados para dibujar de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.
- Si Trasylol® es añadido a las muestras (100 µl/ml), los valores de las muestras se deben multiplicar por 1,1.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

hOST-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		160142	100
Calibrador	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

XIII. 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 0,22 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.

Hormona añadida	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
Fragmento N-terminal 1-18 a 28 mM	18,5	125
Fragmento C-terminal a 5,5 mM	19,2	97

B. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DE RECUPERACIÓN		
OST añadido (ng/ml)	OST Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

- E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA				
Muestra	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

- F. Efecto “hook”

Una muestra con niveles de OST hasta 1000 ng/ml presenta cuentas más elevadas que el último punto de calibración.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/ó 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.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

Sujetos sanos obtienen valores de 5 a 25 ng/ml (2,5 a 97,5 percentilos).

Patología	nr. de sujetos	X ± SD ng/ml
Sujetos sanos	61	13,7 ± 5,5
Mujeres premenopáusicas	19	10,6 ± 3,1
Mujeres postmenopáusicas	25	15,6 ± 5,9
Pacientes con hipercalcemia inducida por tumor	29	13,0 ± 12,0
Pacientes con hiperparatiroidismo	14	31,6 ± 14,7
Pacientes con hipoparatiroidismo	18	5,1 ± 3,2

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

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 cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

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

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.

9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
"Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin".
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADO RES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	50	-
Muestras, controles	-	-	50
Trazador	50	50	50
Incubación	2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm)		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1381	P.I. Numero : 1700521/es	Revisión nr : 090422/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

hOST -IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης άθικτης οστεοκαλσίνης (OST) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Κιτ hOST-IRMA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου: KIP1381: 96 εξετάσεις
- Γ. Κατασκευάζεται από την: DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A Βιολογικές δράσεις

Η οστεοκαλσίνη ή πρωτεΐνη Gla των οστών (B.G.P) είναι η κύρια μη κολλαγονούχος πρωτεΐνη της μεσοκυττάριας ουσίας του οστού. Έχει μοριακό βάρος 5800 Da και περιέχει 49 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων 3 υπολειμμάτων γ καρβοξυλογλουταμικού οξέος. Η σύνθεση της οστεοκλασίνης γίνεται στο οστό από τους οστεοβλάστες. Μετά την παραγωγή της, ενσωματώνεται εν μέρει στη μεσοκυττάρια ουσία του οστού και η υπόλοιπη βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η ακριβής φυσιολογική λειτουργία της οστεοκαλσίνης είναι ακόμη ασαφής. Μεγάλος αριθμός μελετών δείχνουν ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα της οστεοκαλσίνης αντανακλούν το ρυθμό ανάπτυξης των οστών.

B. Κλινική εφαρμογή

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της οστεοκαλσίνης στο αίμα είναι πολύτιμος για:

- Τον εντοπισμό γυναικών που αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο να αναπτύξουν οστεοπόρωση
- Την παρακολούθηση του μεταβολισμού των οστών κατά τη διάρκεια της περιεμμηνοπαυσιακής και της μετεμμηνοπαυσιακής περιόδου
- Την παρακολούθηση του μεταβολισμού των οστών κατά τη διάρκεια θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης και θεραπείας προεμμηνοπαυσιακών γυναικών με αγωνιστές LH-RH
- Την παρακολούθηση του μεταβολισμού των οστών σε ασθενείς με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, υποθυρεοειδισμό, υπερθυρεοειδισμό, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση hOST-IRMA της DIAsource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια εμφανίζουν κατ' αρχήν χαμηλή συγγένεια προς τα Mabs1. Προσθήκη Mab2, του αντισώματος σηματοδότησης που είναι σημασμένο με ¹²⁵I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανάκλα τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Η χρήση αρκετών διακριτών Mabs εμποδίζει την υπερειδικότητα, κάτι που είναι σύνηθες σε IRMA δύο σημείων.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματικό ς κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με Αντι-OST (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	καφέ	Έτοιμο για χρήση
Ab ¹²⁵I IXNHΘΕΤΗΣ: Αντι-OST (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ¹²⁵Iωδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με βόεια ορολευκωματίνη, αζίδιο (<0,1%), EDTA, αναστολείς πρωτεάσης και μια αδρανής κόκκινη χρωστική	1 φιαλίδιο 5,5 ml 440 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό χωρίς οστεοκαλσίνη με βενζαμιδίνη και αναστολείς πρωτεάσης	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημ ένο	κίτρινο	Προσθέστε 1,0 ml απεσταγμένου νερού
CAL N Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό χωρίς οστεοκαλσίνη με βενζαμιδίνη και αναστολείς πρωτεάσης	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Υλικά ελέγχου 1και 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη, βενζαμιδίνη και αναστολείς πρωτεάσης	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	ασhimί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2. Η οστεοκαλσίνη για την παρασκευή των βαθμονομητών είναι ανθρώπινης προέλευσης.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Trasylol® στα 10000 IU/ml
- Πιπέτες για διανομή: 50 µl, 500 µl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμείκτης στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
- Συσκευή φυγοκέντρισης με σύστημα ψύξης
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση

- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Πραγματοποιήστε την ανασύσταση του μηδενικού βαθμονομητή με 1 ml απεσταγμένου νερού και των βαθμονομητών 1-5 με 0,5 ml.
- B. **Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και τα υλικά ελέγχου είναι πολύ ασταθή, χρησιμοποιήστε τα αμέσως μετά την ανασύσταση. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20° C. Η κατάψυξη θα πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη χρήση, για την κατάψυξη μη περιμένετε να διανεμηθούν με πιπέτα όλα τα δείγματα. Αποφύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός ή το πλάσμα με EDTA και ηπαρίνη παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.
- Συλλέξτε το αίμα με φλεβοπαρακέντηση, προσέχοντας ώστε να αποφύγετε την αιμόλυση. Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε παγόλoutρο. Διαχωρίστε το πλάσμα ή τον ορό από τα κύτταρα εντός 3 ωρών. Συνιστάται η χρήση συσκευής φυγοκέντρισης με σύστημα ψύξης. Προσθέστε 100 µl Trasylol® (10000 IU/ml) στο πλάσμα ή στον ορό αμέσως μετά τη φυγοκέντριση (για να λάβετε 1000 IU Trasylol® ανά ml δείγματος). Με αυτήν την επεξεργασία τα δείγματα παραμένουν σταθερά για 3 ημέρες στους 2-8° C. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τα δείγματα πρέπει να καταψύχονται (- 20° C), ωστόσο μπορείτε να αποψύξετε τα δείγματα μόνο μία φορά! Για επανειλημμένη εξέταση, καταψύξτε τα δείγματα σε κλάσματα και απορρίψτε κάθε δείγμα μετά την πρώτη απόψυξη.
- Μη χρησιμοποιείτε πλάσμα κυτρίκων, δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση ή λιπαιμικά δείγματα.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- B. **Διαδικασία**
1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
2. Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 50 µl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.

3. Διανείμετε 50 μl ιχνηθέτη αντι-OST-¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επωάστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε το υπόλοιπο υγρό.
11. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της OST (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
5. Αν προστεθεί στα δείγματα Trasylol® (100 μl/ml), οι τιμές των δειγμάτων πρέπει να πολλαπλασιαστούν επί 1,1.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

hOST-IRMA		cpm	B/T (%)
Συνολική μέτρηση		160142	100
Βαθμονομητής	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο των άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,22 ng/ml.

B. Ειδικότητα

Αυτή η μέθοδος ανιχνεύει την άθικτη ανθρώπινη οστεοκαλσίνη. Σε ένα χαμηλής και σε έναν υψηλής τιμής βαθμονομητή προστέθηκαν κλάσματα άκρου N και κλάσματα άκρου C, στα μέγιστα επίπεδά τους που βρέθηκαν σε φυσιολογικά και σε παθολογικά δείγματα. Στις συγκεντρώσεις αυτές δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντίδραση.

Προστεθείσα ορμόνη	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
Κλάσμα 1-18 άκρου N στα 28 mM	18,5	125
Κλάσμα άκρου C στα 5,5 mM	19,2	97

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	Επανάληψη	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	Επανάληψη	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ		
Προστεθείσα OST (ng/ml)	Ανακτηθείσα OST (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ				
Δείγμα	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με OST έως 1000 ng/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.
Για υγιή άτομα ελήφθησαν τιμές που κυμαίνονταν από 5 έως 25 ng/ml (εκατοστημύρια από 2,5 έως 97,5).

Παθολογία	Αριθμός ατόμων	X ± T.A. ng/ml
Υγιή άτομα	61	13,7 ± 5,5
Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες	19	10,6 ± 3,1
Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες	25	15,6 ± 5,9
Ασθενείς με υπερασβεστιαμία προκαλούμενη από όγκο	29	13,0 ± 12,0
Ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό	14	31,6 ± 14,7
σθενείς με υποπαραθυρεοειδισμό	18	5,1 ± 3,2

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια
Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μολύβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
"Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin".
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (ml)	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ (ml)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) Υλικά ελέγχου (ml)
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, Υλικά ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Επώαση	120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	- -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	- -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP1381	Αριθμός P.I.: 1700521/el	Αρ. αναθεώρησης: 090422/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

hOST-IRMA

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Kit para ensaio imuno-radiométrico para determinação quantitativa *in vitro* da osteocalcina intacta (OST) humana no soro e no plasma.

II. INFORMAÇÃO GERAL

A. Nome do proprietário : Kit DIAsource hOST-IRMA

B. N° de catálogo : KIP1381 : 96 testes

C. Produzido por : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Para assistência técnica ou encomendas contacte:
Tel : +32 (0)67 88 99 99 - Fax : +32 (0)67 88 99 96

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-Irma é um ensaio imunoradiométrico baseado na separação em tubo revestido. Os Mabs1, capturadores de anticorpos (Ac), são ligados à superfície interna inferior, do tubo de plástico. Os calibradores ou amostras adicionados aos tubos vão inicalmente, demonstrar baixa afinidade para o Mabs1. A adição do Mab2, O Ac sinal , marcado com ¹²⁵I, vai completar o sistema e despoletar a reacção imunológica. Depois da lavagem, a actividade radioactiva remanescente ligada ao tubo, reflecte a concentração de antigénio (Ag). A utilização de vários Acs diferentes evita a hiperespecificidade, comum aos IRMA de 2 locais.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 testes	Código de cor	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti OST (Acs monoclonais)	2 x 48	castanho	Pronto a utilizar			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcador: anti-OST marcado com ¹²⁵ I (Acs monoclonais) em tampão TRIS com soro bovino albumina, azida(<0,1%), EDTA, inibidores da protease e corante inerte	Ab	¹²⁵ I	1 recipiente 5,5 ml 440 kBq	vermelho	Pronto a utilizar	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador Zero em soro humano sem osteocalcina com benzamidina e inibidores de protease	CAL	0	1 recipiente lioofilizado	amarelo	Adicione 1 ml de água destilada	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrador - N = 1 a 5 (ver valores exactos nos rótulos dos recipiente) em soro humano sem osteocalcina com benzamidina e inibidores de protease	CAL	N	5 recipientes lioofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solução de lavagem (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlos - N = 1 ou 2 Em soro humano com timol, benzamidina e inibidores de protease	CONTROL	N	2 recipientes lioofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTROL	N					

Note:

1. Use o Calibrador Zero para diluições da Amostra.
2. A origem da osteocalcina para a preparação dos calibradores é humana.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

1. Água destilada
2. Trasylol® a 10000IU/ml
3. Pipetas automáticas de: 50 µl, 500 µl e 1 ml (recomenda-se o uso de pipetas adequadas com pontas descartáveis)
4. Seringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavagem
5. Agitador de tubos (400 rpm)
6. Sistema de aspiração (opcional)
7. Misturador vortex
8. Agitador magnético
9. Centrifugação Refrigerada
10. Qualquer contador gama com capacidade para medir ¹²⁵I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. **Calibradores** : Reconstitua o calibrador zero com 1,0 ml de água destilada e outros calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- B. **Controlos** : Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- C. **Solução de Lavagem de Trabalho**: Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho ao adicionar 69 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (70x). 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.
- 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. A congelação deverá ser imediatamente realizada após a utilização. Não espere para congelar até todas as amostras estarem pipetadas.
- A Solução de Lavagem de Trabalho recentemente preparada deve ser utilizada no mesmo dia.
- Após a 1ª utilização, o marcador é estável até ao final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original bem fechado, entre 2 a 8°C
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Soro, plasma com EDTA ou plasma heparinizado dão resultados similares.
- Recolha o sangue por venipunctura, tomando cuidado para evitar a hemólise. As amostras devem ser mantidas num banho de gelo. Separe o plasma ou o soro das células no prazo de 3 horas. Recomenda-se a utilização de centrifugação refrigerada. Adicione 100 µl de Trasylol® (10000IU/ml) ao plasma ou soro imediatamente após a centrifugação (para obter 1000 IU de Trasylol® 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 plasma com citrato, amostras hemolizadas ou amostras lipémicas.

X. PROCEDIMENTO

- A. **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. Para evitar contaminações cruzadas, use uma pipeta com ponta descartável para a adição de cada reagente e amostra. As pipetas de precisão elevada ou a pipetagem automática vão aumentar a precisão. Respeite os tempos de incubação. Prepare uma curva padrão para cada análise e não utilize dados de análises anteriores.
- B. **Procedimento**
1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra e controlo. Para a determinação de contagens totais, marque 2 tubos normais.
2. Misture por breves momentos, no misturador vortex calibradores, controlos, amostras e dispense 50 µl de cada para os tubos respectivos.
3. Dispense 50 µl de marcador para cada tubo.
4. Agite manualmente o tabuleiro (rack) que contém os tubos.
5. Incube durante 2 h à temp. ambiente com agitação contínua (400 rpm).
6. Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais). Certifique-se que a ponta de plástico do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remoção de todo o líquido.
7. Lave os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais). Evite a formação de espuma durante a adição de Solução de Lavagem de Trabalho
8. Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo(excepto as contagens totais).

9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Conte os tubos no contador gama durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicado.
2. Em papel semilogaritmico ou de gráfico linear desenhe o c.p.m. (ordenadas para cada padrão contra a concentração correspondente de OST (abscissas) e desenhe uma curva padrão (de calibração) através dos pontos padrão e rejeite os pontos marginais (outliers) óbvios.
3. Leia a concentração para cada controlo e amostra por interpolação na curva de calibração.
4. A redução dos dados através de computador simplificará estes cálculos. Se o processamento dos resultados for automático, é recomendado um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros.
5. Se for adicionado Trasylol® às amostras (100 µl/ml), os valores da amostragem devem 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-IRMA		cpm	B/T (%)
Contagem Total		160142	100
Calibrador	0,0 ng/ml	197	0,12
	1,9 ng/ml	2050	1,27
	4,5 ng/ml	5467	3,40
	19,5 ng/ml	26254	16,31
	46,0 ng/ml	60957	37,86
	69,0 ng/ml	86764	53,89

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

- A. Limite da detecção

Foram analisados 20 calibradores zero juntamente com outros calibradores.
O limite de detecção, definido como a concentração aparente 2 dp acima da média de contagem com 0 ligações foi de 0,22 ng/ml.
- B. Especificidade

Este método detecta a osteocalcina humana intacta. Os fragmentos de terminal-N e terminal-C, nos níveis máximos encontrados em amostras normais e patológicas, foram adicionados a um calibrador de valor baixo a elevado. Não foi observada reactividade cruzada nestas concentrações.

Hormona adicionada	OST CAL 1 ng/ml	OST CAL 2 ng/ml
-	20	100
Fragmento de terminal-N 1-18 a 28 mM	18,5	125
Fragmento de terminal-C a 5,5 mM	19,2	97

C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	CV (%)
A	10	2,99 ± 0,06	2,0	A	10	9,03 ± 0,54	5,9
B	10	8,60 ± 0,08	1,0	B	10	20,1 ± 0,4	4,2
C	10	20,0 ± 0,2	1,0				

DP : Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE RECUPERAÇÃO		
OST Adicionado (ng/ml)	OST Recuperado (ng/ml)	Recuperação (%)
7,5	7,6	101
15,0	14,6	97
30,0	32,9	109
60,0	73,3	122

TESTE DE DILUIÇÃO			
Amostra	Diluição	Conc. teórico. (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

As amostras foram diluídas com Calibrador Zero.

Não existe material de referência internacional para este parâmetro, que seja do nosso conhecimento.

- F. Atraso de tempo entre o último calibrador e a dispensa da amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 30 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

ATRASO DE TEMPO				
Amostra	0'	10'	20'	30'
X	3,4	3,3	3,3	3,4
Y	8,8	9,1	8,8	8,7
Z	20,5	20,8	20,4	20,8

- G. Efeito”Hook”

Uma amostra com OST até 1000 ng/ml apresenta contagens superiores do que o 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 que haja uma explicação satisfatória para a discrepância verificada.
- Se tal for desejável, cada laboratório pode fazer os seus pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas na forma de alíquotas congeladas.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas Laboratoriais.

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 (2,5 a 97,5 por cento).

Patologia	Nº de indivíduos	X ± SD ng/ml
Indivíduos saudáveis	61	13,7 ± 5,5
Mulheres na pré-menopausa	19	10,6 ± 3,1
Mulheres da pós-menopausa	25	15,6 ± 5,9
pacientes com hipercalcemia induzida por tumor	29	13,0 ± 12,0
pacientes com hiperparatiróidismo	14	31,6 ± 14,7
pacientes com hipoparatiroidismo	18	5,1 ± 3,2

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança
Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes.
Este produto radioactivo pode ser transferido para e utilizado apenas por pessoas autorizadas; a aquisição, conservação, uso e troca de produtos radioactivos está sujeita a legislação nacional. Em caso algum este produto poderá ser administrado a seres humanos ou a animais.
Toda a manipulação de material radioactivo deve ser executado em área própria longe de locais de passagem. Deve ser mantido no laboratório um livro de notas (log book) para a recepção e conservação dos materiais radioactivos. O equipamento de laboratório contaminado e as substâncias perigosas devem ser eliminadas e separadas para evitar contaminação por diferentes isótopos.
Quaisquer derrames de material radioactivo devem ser imediatamente limpos de acordo com os procedimentos de rádio-segurança. O lixo radioactivo deve ser descartado de acordo com a legislação local e com as directrizes vigentes. A adesão às regras básicas de segurança com material radioactivo confere a protecção adequada.
O material de origem humana utilizado na preparação do reagente foi testado e considerado não reactivo ao antigénio 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.
A azida sódica pode reagir com as canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Portanto, deixar fluir água em abundância nos tubos durante a eliminação de líquidos para prevenir a acumulação de azidas². Evitar contacto com a pele, olhos e mucosas (azida sódica como conservante) Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete pela boca. Use vestuário de protecção e luvas descartáveis.

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.

9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996)
Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin.
European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (ml)	CALIBRA- DORES (ml)	AMOSTRA(S) CONTROLOS (ml)
Calibradores (0-5) Amostras, Controlos Marcador	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Incubação	2 h à temp. ambiente com agitação contínua (400 rpm)		
Separação Solução de Lavagem de Trabalho Separação Solução de Lavagem de Trabalho Separação	- - - - -	Aspire (ou decante) 2,0 Aspire (ou decante) 2,0 aspire (ou decante)	
Contagem	Conte os tubos durante 60 seg		

Nº de catalogo DIAsource : KIP1381	Nº de P.I. : 1700521/pt	Nº de revisão : 090422/1
---------------------------------------	----------------------------	-----------------------------

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylen glykol
	Solução de Extração	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σοληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylenglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>		
	Вижте инструкцията за работа		
	Температура на съхранение		
	Използвайте с		
	Партиден код		
	Каталожен номер		
	Контрол		
	Ин витро диагностично медицинско изделие		
	Производител		
	Съдържание достатъчно за <n> теста		
	Концентриран измиващ разтвор		
	Нулев калибратор		
	Калибратор #		
	Контрол #		
	Трейсър		
	Трейсър		
	Концентриран маркер		
	Концентриран маркер		
	Епруветки		
	Инкубационен буфер		
	Ацетонитрил		
	Серум		
	Разредител за пробите		
	Буфер за разреждане		
	Антисерум		
	Имуноабсорбент		
	Разредител за калибратора		
	Пресъздаващ разтвор		
	Полиетилен гликол		
	Екстрактов разтвор		
	Разтвор за елюиране		
	Силикагелни пълнители		
	Пред-лечебен разтвор		
	Неутрализиращ разтвор		
	Маркерен буфер		
	Микротитърна пластина		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгиран концентрат		
	HRP конюгиран концентрат		
	Буфер за конюгата		
	Хромогенен TMB концентрат		
	Хромогенен TMB разтвор		
	Субстратен буфер		
	Стоп разтвор		
	Инкубационен серум		
	Буфер		
	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза		
	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат		
	Биотин конюгиран концентрат		
	Авидин HRP концентрат		
	Буфер за пробите		
	Биотин конюгат		
	специфично анти тяло		
	стрептавидин HRP концентрат		
	не специфично свързване		
	второ анти тяло		
	киселинизиращ буфер		