



hOST-IRMA

KIP1381

For Informational/Research Purposes Only

Distributed By:



Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-America)

8201 Central Ave. NE, Suite P

Minneapolis, Minnesota 55432, USA

Phone: (888) 523-1246

Fax.: (763) 780-2988

Email: info@ibl-america.com

Web: www.ibl-america.com

For Informational/Research Purposes Only

LOT : 110218/1

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Osteocalcin or bone Gla protein (B.G.P) is the major non-collagen protein of the bone matrix. It has a molecular weight of 5800 Da and contains 49 amino acids, including 3 residues of gamma carboxyl glutamic acid. Osteocalcin is synthesized in the bone by the osteoblasts. After production, it is partly incorporated in the bone matrix and the rest is found in the blood circulation. The exact physiological function of osteocalcin is still unclear. A large number of studies show that the circulating levels of osteocalcin reflect the rate of bone formation.

B. Clinical application


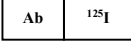

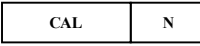

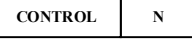
The determination of the blood levels of osteocalcin is valuable for :

- . The identification of women at risk of developing osteoporosis
- . Monitoring bone metabolism during the perimenopause and postmenopause
- . Monitoring bone metabolism during hormone replacement therapy and treatment of premenopausal women with LH-RH agonists
- . Monitoring bone metabolism in patients with growth hormone deficiency, hypothyroidism, hyperthyroidism, chronic renal failure

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The 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 ¹²⁵I, 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
 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	1 vial 5.5 ml 440 kBq	red	Ready for use
 Zero calibrator in osteocalcin free human serum with benzamidine and protease inhibitors	1 vial lyophil.	yellow	Add 1.0 ml distilled water
 Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in osteocalcin free human serum with benzamidine and protease inhibitors	5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls 1 and 2 in human serum with thymol, benzamidine and protease inhibitors	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note:

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

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Trasylo® 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 ¹²⁵I 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 Trasylo® (10000IU/ml) to the plasma or serum immediately after centrifugation (to obtain 1000 IU Trasylo® 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-¹²⁵I 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 Trasylo® 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. LIMITATIONS

Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.

- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. 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

XVI. 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

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (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.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

- J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984)
"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis".
The Lancet, 1091-1093.
- P.A. PRICE. (1985)
"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function".
Vitamins and hormones, 42,65-108.
- R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988)
"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment".
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
- S. MINISOLA and al. (1988)
"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery".
Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.

- L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988)
"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment".
Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
- J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990)
"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy".
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
- M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991)
"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications".
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
- B. DEMIAUX, M.E. 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.
- 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.

XIX. 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 Working Wash solution	- -	aspirate (or decant) 2.0	
Separation Working Wash solution	- -	aspirate (or decant) 2.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1381	P.I. Number : 1700521/en	Revision Number: 110218/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Revision date : 2011-02-18

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

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 moelle 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



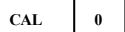


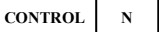
La détermination du taux sanguin en ostéocalcine est utile pour :

- . 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 plastique. 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
 Ab ¹²⁵I 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	1 flacon 5,5 ml 440 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
 CAL 0 Calibrateur zéro dans du sérum humain libre d'ostéocalcine avec de la benzamidine et des inhibiteurs de protéase	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 CAL N 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	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec du thymol, de la benzamidine et des inhibiteurs de protéase	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note:

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

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

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

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 1,0 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- 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 véniponcture, 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

- 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.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
- Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
- 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.
- 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.
- 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.

DELAJ				
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. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro. Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps. Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CÔNTRÔLE 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 contrôlés, 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.

XVI. 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

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (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.

XVIII. 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 diphosphate 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.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

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

DIASource Catalogue Nr : KIP1381	P.I. Number : 1700521/fr	Revision nr : 110218/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de revision : 2011-02-18

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

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

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. *Biologische Aktivität*

Osteocalcin oder Knochen Gla Protein ist das bedeutendste nicht-kollagene Protein der Knochenmatrix. Es hat ein Molekulargewicht von 5.800 Da und beinhaltet 49 Aminosäuren, inklusiv 3 Gamma-Carboxyglutamatsäure-Reste. Osteocalcin wird in den Osteoblasten synthetisiert. Nach seiner Bildung ist es zu 80% in die Knochenmatrix inkorporiert. Der Rest wird in die Blutzirkulation abgegeben. Die genaue physiologische Bedeutung von Osteocalcin ist bisher noch unklar. Eine große Anzahl von Publikationen zeigt, dass die zirkulierenden Werte von Osteocalcin die Rate der Knochenformation reflektieren.

B. *Klinische Anwendung*

Die Bestimmung der Blutwerte von Osteocalcin ist nützlich für:

- . die Identifizierung von Frauen mit erhöhtem Risiko zur Osteoporose;
- . Monitoring des Knochenmetabolismus während der Peri- und Postmenopause;
- . Monitoring des Knochenmetabolismus während hormoneller Ersatztherapie und der Behandlung prämenopausaler Frauen mit LH-RH Antagonisten;
- . Monitoring des Knochenmetabolismus von Patienten mit Wachstumshormonmangel, Hypothyreose und Hyperthyreose, chronischer Niereninsuffizienz.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hOST-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 Rinderserumalbumin, 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:

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Dest. Wasser
- Trasylo® (10.000 IE/ml)
- Pipetten: 50 µl, 500 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- Schüttler für Röhrchen (400 rpm)
- Absaugsystem (optional)
- Vortex Mixer
- Magnetrührer
- Kühlzentrifuge
- 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 Kühlzentrifuge ist ratsam. Unmittelbar nach der Zentrifugation sind dem Plasma bzw. Serum 100 µl Trasylo® (10.000 IE/ml) hinzuzufügen (um 1.000 IE Trasylo® 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

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

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- 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.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Wenn 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 Durchschnittswert 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 Kalibrator messwert.

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren. Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden. Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. 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.

XVI. REFERENZINTERVALLE

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

XVII. 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 Laborausstattung 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 Waschstufen 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.

XVIII. 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.

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (ml)	KALIBRATOREN (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	Beipackzettelnummer: 1700521/de	Nummer der Originalausgabe: 110218/1
--------------------------------------	------------------------------------	---

Revisionsdatum : 2011-02-18

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. **Gedeponerd handelsmerk:** DIAsource hOST-IRMA kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1381: 96 testen
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

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

III. **KLINISCHE ACHTERGROND**

A. **Biologische activiteiten**

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

B. **Klinische toepassing**


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

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

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

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 vervolledigen 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" data-bbox="151 683 279 716"> <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" data-bbox="135 862 263 896"> <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" data-bbox="135 996 263 1030"> <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" data-bbox="87 1176 279 1209"> <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 ml gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="111 1288 271 1321"> <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 osteocalcine gebruikt bij de bereiding van de calibratoren is van recombinante origine.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

1. Gedestilleerd water.
2. Trasyol® 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 Trasyol® (10000IU/ml) aan het plasma of serum toe onmiddellijk na het centrifugeren (om 1000 IU Trasyol® 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 ontdooiden.
- 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 wegwerpbaar pipetip 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 totaalstellingen.
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 totaalstellingen) 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 totaalstellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.

8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaalstellingen) op (of decanteer).
9. Was de buizen nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaalstellingen) en zuig op (of decanteer).
10. Na de laatste wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop 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 Trasyolol® 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. Tijdsperiode 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 gecoatete 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. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays.
Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben.
Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. 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.

XVI. 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 hyperparathyroïdisme	14	31,6 ± 14,7
Patiënten met hypoparathyroïdisme	18	5,1 ± 3,2

XVII. 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 plasmamonsters 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.

XVIII. 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. 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.

XIX. 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: 110218/1
--	--	----------------------------

Revisiedatum : 2011-02-18

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

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

B. Aplicaciones clínicas


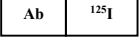
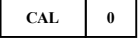
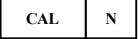
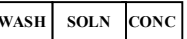
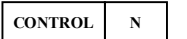
La determinación de los niveles de osteocalcina en la sangre es importante para:

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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 ^{125}I , 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
 TRAZADOR: anti-OST (anticuerpos monoclonales) marcado con ^{125}I en tampón TRIS con albúmina bovina, azida (<0,1%), EDTA, inhibidores de proteasa y un colorante rojo inerte	1 vial 5,5 ml 440 kBq	rojo	Listo para uso
 Calibrador cero en suero humano libre de osteocalcina con benzamidina y inhibidores de proteasa	1 vial liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
 Calibradores N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano libre de osteocalcina con benzamidina y inhibidores de proteasa	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 Controles - N = 1 o 2 en suero humano, thymol, benzamidina y inhibidores de proteasa	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota:

1. Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
2. El origen de la osteocalcina para la preparación de los calibradores es recombinante.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Trasylo[®] a 10000UI/ml
3. Pipetas de 50µl, 500µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
4. Vortex
5. Agitador de tubos (400 rpm)
6. Agitador magnético
7. Centrifuga refrigerada
8. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
9. Sistema de aspiración (opcional)
10. Contador de radiaciones gamma para medir ^{125}I (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 Trasylo[®] (10000IU/ml) al plasma o al suero inmediatamente después de la centrifugación (para obtener 1000 IU de Trasylo[®] 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 número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

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

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

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

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 50 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
6. 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.
7. 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.

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

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o lineal 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
3. Leer la concentración de cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. 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".
5. Si Trasyolol® 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. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro.
Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. 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

XVII. 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.

XVIII. 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. 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.

XIX. 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 : 110218/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2011-02-18

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

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

B. Applicazione clinica


La determinazione dei livelli ematici di osteocalcina è utile per:

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

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 ^{125}I , 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" data-bbox="135 739 263 784"> <tr> <td>Ab</td> <td>^{125}I</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" data-bbox="135 907 263 952"> <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" data-bbox="135 1041 263 1086"> <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" data-bbox="87 1232 319 1276"> <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" data-bbox="87 1355 311 1400"> <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:

- Usare Calibratore zero per diluire i campioni.
- L'osteocalcina usata per la preparazione dei calibratori è di origine ricombinante.

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

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

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

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

- 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

- 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.
- Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- Dispensare 50 µl di marcato in tutte le provette.
- Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- Incubare 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
- 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.
- 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.
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
- 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).
- Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- 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)	Recupero (%)
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. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. 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

XVI. 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

XVII. 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.

XVIII. 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.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli 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 : 110218/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2011-02-18

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.90

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


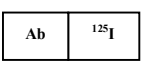
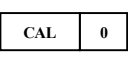
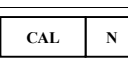
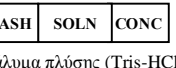
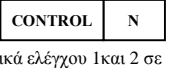
Ο προσδιορισμός των επιπέδων της οστεοκαλσίνης στο αίμα είναι πολύτιμος για:

- 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 υπερευαισθησία, 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
 ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-OST (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ¹²⁵ Ιωδίνη 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
 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό χωρίς οστεοκαλσίνη με βενζαμιδίνη και αναστολείς πρωτεάσης	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημ ένο	κίτρινο	Προσθέστε 1,0 ml απεσταγμένου νερού
 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
 Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Υλικά ελέγχου 1 και 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη, βενζαμιδίνη και αναστολείς πρωτεάσης	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	ασμή	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση:

- Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
- Η οστεοκαλσίνη για την προετοιμασία των βαθμονομητών είναι ανασυνδυασμένης 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)
- Αναμεικτής στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
- Συσκευή φυγοκέντρωσης 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 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Βαθμονομητές:** Πραγματοποιήστε την ανασύσταση του μηδενικού βαθμονομητή με 1 ml απεσταγμένου νερού και των βαθμονομητών 1-5 με 0,5 ml.
- Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- 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 κατάφυξη 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 φλεβοπαράκέντηση, προσέχοντας ώστε να αποφύγετε την αιμόλυση. Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε ψυγείο εντός 3 ωρών. Διαχωρίστε το πλάσμα ή τον ορό από τα κύτταρα εντός 3 ωρών. Συνιστάται η χρήση συσκευής φυγοκέντρωσης με σύστημα ψύξης. Προσθέστε 100 μl Trasylol® (10000 IU/ml) στο πλάσμα ή στον ορό αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση (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 κίτρικών, δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση ή λιπαμικά δείγματα.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- 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 ανάλωσιμο 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

- Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
- Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 50 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.

- Διανείμετε 50 μl ιχνηθέτη αντι-OST-¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανόμενα τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
- Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επλώστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
- 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.
- 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.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]).
- 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).
- Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε το υπόλοιπο υγρό.
- Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- 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 (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίπτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
- 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.

Προσθεθείσα 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

Προσθεθείσα 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. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποικίλου για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντιποικτικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποικίλου.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. 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 διατηρούνται χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μεγέθη δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται καταψυγμένα 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.

XVI. 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 (εκατοστημώρια 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

XVII. 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 μόλυβδο 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 συσσώρευσης 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.

XVIII. 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. 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.

XIX. 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
Επάση	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	
Μέτρηση	Μέτρηση σοληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP1381	Αριθμός P.I.: 1700521/e1	Αρ. αναθεώρησης: 110218/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2011-02-18

For Informational/Research Purposes Only

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. Nº de catálogo : KIP1381 : 96 testes
- C. Produzido por : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA

A. Actividades biológicas

A osteocalcina ou proteína GLA (B.G.P) é a principal proteína não-colagénica da matriz óssea. Possui um peso molecular de 5800 Da e contém 49 aminoácidos, incluindo 3 resíduos de ácido glutâmico carboxil gama. A osteocalcina é sintetizada no osso pelos osteoblastos. Após a produção, é parcialmente incorporada na matriz do osso, encontrando-se o restante na circulação sanguínea. A função fisiológica exacta da osteocalcina mantém-se desconhecida. Um vasto número de estudos demonstrou que os níveis de circulação de osteocalcina reflectem a taxa de formação do osso.

B. Aplicação clínica


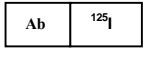
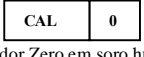
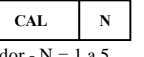
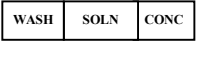
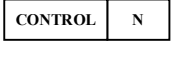
A determinação dos níveis sanguíneos de osteocalcina é importante para:

- . A identificação de mulheres em risco de desenvolverem osteoporose
- . A monitorização do metabolismo ósseo durante a perimenopausa e a pós-menopausa
- . A monitorização do metabolismo ósseo durante a terapia de substituição hormonal e o tratamento de mulheres em pré-menopausa com agonistas LH-RH.
- . A monitorização do metabolismo ósseo em pacientes com deficiência da hormona de crescimento, hipotiróidismo, hipertiróidismo e insuficiência renal crónica.

IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O DÍASource 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 inicialmente, demonstrar baixa afinidade para o Mabs1. A adição do Mab2, O Ac sinal, marcado com ^{125}I , 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
 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	1 recipiente 5,5 ml 440 kBq	vermelho	Pronto a utilizar
 Calibrador Zero em soro humano sem osteocalcina com benzamidina e inibidores de protease	1 recipiente liofilizado	amarelo	Adicione 1 ml de água destilada
 Calibrador - N = 1 a 5 (ver valores exactos nos rótulos dos recipientes) em soro humano sem osteocalcina com benzamidina e inibidores de protease	5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada
 Solução de lavagem (Tris-HCl)	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
 Controlos - N = 1 ou 2 Em soro humano com timol, benzamidina e inibidores de protease	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada

Note:

- Use o Calibrador Zero para diluições da Amostra.
- A origem da osteocalcina para a preparação dos calibradores é recombinante.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

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

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Calibradores** : Reconstitua o calibrador zero com 1,0 ml de água destilada e outros calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- Controlos** : Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- 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

- Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra e controlo. Para a determinação de contagens totais, marque 2 tubos normais.
- Misture por breves momentos, no misturador vortex calibradores, controlos, amostras e dispense 50 µl de cada para os tubos respectivos.
- Dispense 50 µl de marcador para cada tubo.
- Agite manualmente o tabuleiro (rack) que contém os tubos.
- Incube durante 2 h à temp. ambiente com agitação contínua (400 rpm).
- 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.
- 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
- 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 de 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.

ATRASSO 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. LIMITAÇÕES

- Amostras de pacientes que receberam preparações de anticorpos monoclonais de camundongos para diagnóstico ou terapia podem conter anticorpos humanos anti-camundongos (HAMA). Essas amostras podem apresentar tanto valores falsamente elevados ou diminuídos quando testado com kits de teste que utilizam anticorpos monoclonais de camundongos.
- Anticorpos heterofílicos no soro humano podem reagir com o reagente de imunoglobulinas, interferindo com os imunoenaios. Os pacientes rotineiramente expostos a animais ou produtos de soro animal podem estar propensos a esse tipo de interferência e valores anômalos podem ser observados no caso da presença de anticorpos heterofílicos. Avaliar cuidadosamente os resultados de pacientes com suspeita de ter esses anticorpos. Se os resultados não forem consistentes com outras observações clínicas, informação adicional deve ser exigida antes do diagnóstico.

XV. 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.

XVI. 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

XVII. 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.

XVIII. 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 diphosphate 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. FOTTELL. (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.

XIX. RESUMO DO PROTOCOLO

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

Nº de catalogo DIAsource : KIP1381	Nº de P.I. : 1700521/pt	Nº de revisão : 110218/1
------------------------------------	-------------------------	--------------------------

Data da revisão : 2011-02-18

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 1251	Tracer
Ab 1251	Tracer
Ag 1251 CONC	Tracer concentrated
Ab 1251 CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
UJ	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

	<u>Gebruikte symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
I V D	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieoplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
U U	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjuugaat
Ag HRP	HRP Conjuugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjuugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjuugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjuugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjuugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjuugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjuugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzuringbuffer

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
TLT	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación

	<u>Simboli utilizzati</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluyente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluyente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Poli(etil)englicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
UJ	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
I V D	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιχνηθέτης
Ab 125I	Ιχνηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
	Σωληνάριο
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυ(εθιλενογλυκόλη)
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλυσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
μπλ	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consulte instruções de utilização
	Temperatura de conservação
	Utilizar antes de
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Controlo
I V D	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
CAL 0	Calibrador zero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Controlo #
Ag 125I	Marcador
Ab 125I	Marcador
Ag 125I CONC	Marcador concentrada
Ab 125I CONC	Marcador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampão de incubação
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Soro
DIL SPE	Diluidor de espécimes
DIL BUF	Tampão de diluição
ANTISERUM	Anti-soro
IMMUNOADSORBENT	Imunoadsorvente
DIL CAL	Diluyente do calibrador
REC SOLN	Solução de Reconstituição
PEG	Poli(etil)eno-glicol
EXTR SOLN	Solução de Extração
ELU SOLN	Solução de Eluição
GEL	Cartuchos de sílica Bond Elut
PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
NEUTR SOLN	Solução de neutralização
TRACEUR BUF	Tampão Marcador
TIT	Placa de micro titulação
Ab HRP	HRP Conjugação
Ag HRP	HRP Conjugação
Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
CONJ BUF	Conjuge o tampão
CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
SUB BUF	Tampão de substrato
STOP SOLN	Solução de Paragem
INC SER	Soro de incubação
BUF	Tampão
Ab AP	AP Conjugação
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
ASS BUF	Tampão de ensaio
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticorpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
NSB	Ligações não específicas
2nd Ab	Anticorpo secundário
ACID BUF	Tampão de acidificação