

N-tact[®] Osteo SP
Osteocalcin IRMA Kit

For the quantitative determination of
intact human osteocalcin 1-49 in serum

Instruction Manual

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manual de Instrucciones

Manuale di Istruzioni

Manual de instruções

Bruksanvisning

Εγχειρίδιο οδηγιά

REF: 32300

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English	Page 1
Français	10
Deutsch	21
Español	31
Italiano.....	41
Português.....	51
Svenska	61
Ελληνικά.....	70

N-TACT[®] OSTEO SP OSTEOCALCIN IMMUNORADIOMETRIC ASSAY

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE

This kit contains instructions and materials for the quantitative determination of intact human osteocalcin 1-49 in serum by immunoradiometric assay (IRMA).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Osteocalcin is a 5900 dalton vitamin K dependent protein which has been described as one of the most abundant non-collagenous proteins in bone. Osteocalcin may account for up to 3% of total bone protein and contains two or three amino acid residues of gamma carboxyglutamic acid (GLA), hence the designation bone GLA protein (BGP).¹ BGP or osteocalcin is found only in bone tissue and is known to be a product of the osteoblast.²

It is believed to play a role in the mineralization process and is under the influence of the other calcium regulating hormones: calcitonin,³ parathyroid hormone and vitamin D.^{4,5,6} Because the levels of osteocalcin are a direct reflection of bone formation, its measurement closely correlates with the status of the bone metabolism of the patient.

While such measurements as alkaline phosphatase and hydroxyproline have been widely used as biochemical markers of bone metabolism, there have been significant limitations to their usefulness because they tend to be nonspecific. Generally, osteocalcin correlates with alkaline phosphatase, but occasionally, much of the alkaline phosphatase in the blood may be of non-bone origin. This limits its usefulness as a specific marker of bone turnover. Osteocalcin, however, is completely specific for bone. It has been found to be elevated in the following disorders: Osteomalacia,⁷ Paget's disease of the bone,⁸ hyperthyroidism,⁹ primary hyperparathyroidism and renal osteodystrophy.¹⁰ Osteocalcin is variably elevated in postmenopausal osteoporosis depending on whether there is high or low bone turnover.³ Reduced levels of osteocalcin are found in hypoparathyroidism,^{11,12} or long term corticosteroid therapy.^{9,13}

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin Osteocalcin immunoradiometric assay (IRMA) measures intact human osteocalcin 1-49 with no cross-reactivity to the 1-43 fragment. This assay utilizes human osteocalcin 1-49 for calibrators and controls and two polyclonal antibodies that have been purified using affinity chromatography. These purified antibodies are specific for two different regions of the osteocalcin molecule. The first antibody, specific for the amino terminus of human osteocalcin, is bound to a solid phase (polystyrene beads). The second antibody is specific for the carboxy terminus of human osteocalcin and is labeled with ¹²⁵I. Samples are incubated on an orbital agitator at room temperature for 2 hours. Intact human osteocalcin 1-49 is the only form of osteocalcin that will be bound by both the antibody on the bead and the ¹²⁵I labeled antibody. Following the incubation period, each bead is washed to remove the unbound labeled antibody. The radioactivity present in the remaining bound labeled antibody is then measured using a gamma counter. The concentration of osteocalcin 1-49 present in the sample is directly proportional to the radioactivity measured.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

N-Tact Osteo SP Calibrators 0-5	6 vials/1.0 mL
N-Tact Osteo SP Beads	1 container/100 beads
¹²⁵ I N-Tact Osteo SP Antibody	3 vials/11 mL
N-Tact Osteo SP Wash Solution Conc.	1 vial/ 50 mL
N-Tact Osteo SP Controls	2 vials/1.0 mL
Number of tests	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Store all reconstituted reagents at -15°C, or lower, until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 N-tact® Osteo SP Calibrators (0-5): lyophilized reagent

Six human osteocalcin 1-49 calibrators, at nominal concentrations ranging from 0 to 200 ng/mL (0.0 nmol/L - 33.9 nmol/L). The calibrators must be reconstituted with 1.0 mL of purified water before use. Reconstituted calibrators should not be subjected to more than two freeze thaws. The DiaSorin N-tact® Osteo SP Kit is standardized by quantitative amino acid analysis. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

4.2 N-tact® Osteo SP Controls, Level 1 and Level 2: lyophilized reagent

Buffered clarified human serum containing Trasylol at 400 KIU/mL and 0.1% sodium azide spiked with human osteocalcin 1-49. The controls must be reconstituted with 1.0 mL of purified water before use. Reconstituted controls should not be subjected to more than two freeze thaws.

4.3 N-tact® Osteo SP Beads: ready to use reagent

Polystyrene beads coated with affinity purified goat antibody specific for the amino terminus of human osteocalcin.

4.4 ¹²⁵I N-tact® Osteo SP Tracer: ready to use reagent

Affinity purified goat antibody, specific for the carboxy terminus of human osteocalcin, labeled with iodine-125 and diluted in buffered goat serum containing 0.2% sodium azide and 0.2% gentamicin sulfate.

4.5 10X Wash Solution: concentrated reagent

10X concentrate of phosphate buffer and Tween 20. Dilute ten fold with purified water prior to use.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV, and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV), or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 30 μCi (1110 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

- 6.1 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.2 A decrease in maximum binding.
- 6.3 High nonspecific zero binding.
- 6.4 Poor duplicate values.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Twenty microliters of serum, in duplicate, are required for use in the N-tact® Osteo SP Kit. Osteocalcin has been shown to exhibit a marked diurnal variation with a maximum level at night and a minimum in late morning or early afternoon.¹⁴ Because of this, time of sampling must be taken into account when interpreting results. Collect blood by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. Allow the blood to clot at room temperature. Spin blood samples for fifteen minutes in a refrigerated centrifuge to obtain hemolysis free serum. Promptly separate the serum from the cells and freeze immediately. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be free of any contamination. Samples may be stored for up to six months at -20°C. If longer storage is needed, samples should be kept at -70°C or colder.

8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- 8.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.
- 8.2 Test tube rack.
- 8.3 Calibrated gamma counter capable of counting 125 iodine.
- 8.4 Vortex mixer.
- 8.5 Pipetting devices:
 - a. Micropipettor calibrated to deliver 20 µL.
 - b. Repeating dispensers calibrated to deliver 300 µL and 1 mL.
 - c. Volumetric pipettes for reconstituting controls and calibrators.
- 8.6 Parafilm or equivalent for covering test tubes.
- 8.7 Teflon-coated forceps or other kit-approved device for dispensing beads.
- 8.8 Aspiration unit to aspirate ¹²⁵I antibody and wash solution.
- 8.9 Orbital agitator capable of 190 ± 10 rpm with an approximate orbital diameter of 2 cm.
- 8.10 Purified water.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1 Reconstitute the lyophilized reagents and dilute the 10X Wash Solution (see Reagents Section). Mix the reconstituted calibrators and controls thoroughly. Allow the tracer and beads to equilibrate at room temperature. Allow any frozen samples to thaw completely. Keep calibrators, controls, and thawed samples on ice while setting up assay.
- 9.2 Set up labeled 12 x 75 mm borosilicate glass in duplicate according to the scheme of the assay, on the back page.
- 9.3 Add reagents to the tubes as follows:
 - a. **0 Calibrator**
20 µL of 0 Calibrator
300 µL of Tracer (red)
 - b. **Calibrators (A-E)**
20 µL of Calibrator
300 µL of Tracer (red)
 - c. **Controls and unknown samples**
20 µL of control or unknown sample
300 µL of Tracer (red)
 - d. **Total Count tubes**
300 µL of Tracer (red)
- 9.4 Vortex all tubes.
- 9.5 Dispense one bead into each tube (EXCEPT the Total Count tubes) with teflon-coated forceps or suitable dispenser for handling beads. (Do not use fingers.)

- 9.6 Cover the tubes with parafilm or equivalent.
- 9.7 Agitate the tubes on an orbital agitator at 190 ± 10 rpm for 2 hours \pm 5 minutes at 20 - 25°C.
- 9.8 Aspirate the reaction mixture from each tube (EXCEPT the Total Count tubes).
- 9.9 Wash the beads by vigorously dispensing 1 mL of diluted Wash Solution into each tube (EXCEPT the Total Count tubes) with sufficient force to raise the bead from the bottom of the test tube. Aspirate Wash Solution. Repeat wash procedure two more times.
- 9.10 Measure the radioactivity present in each tube using a gamma counter.

10. PROCEDURAL COMMENTS

- 10.1 Assay all samples in duplicate to ensure confidence in values obtained.
- 10.2 Pipette samples and tracer into the lower one third of the test tube.
- 10.3 When adding beads to the tubes, tilt the test tube rack slightly and allow beads to roll into the tubes. This will prevent excessive splashing of the test solution. Do not handle beads with fingers.
- 10.4 For a shaker with an orbital diameter less than 2 cm, adjust the speed accordingly to allow vigorous shaking.
- 10.5 To completely monitor the consistent performance of an IRMA assay, there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a check of the following parameters.
 - a. **Total Counts**
 - b. **% Maximum Binding**

$$\frac{(\text{CPM of E calibrator} - \text{CPM of 0 calibrator})}{(\text{CPM of Total Counts} - \text{CPM of 0 calibrator})} \times 100$$
 - c. **Nonspecific Binding**
CPM of 0 Calibrator Tubes
- 10.6 To convert ng/mL to nmol/L; $\text{ng/mL} \times 0.1695 = \text{nmol/L}$.

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory must include at least one high and one low control in every assay to monitor assay performance. The controls provided with the kit may be utilized for this purpose. The kit controls contain osteocalcin at both high and low concentrations and have been assayed using the DiaSorin N-tact® Osteo SP Kit to establish expected ranges. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs. The controls should be treated as unknown samples and assayed in duplicate. Assays should be considered valid only if results meet the laboratory's criteria for acceptability.

12. CALCULATION OF RESULTS

To determine the concentration of Osteocalcin found in control and unknown samples, a calibrator curve is prepared using the calibrator concentrations stated on the vial labels. Values are generated as follows:

- 12.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control and unknown sample.
- 12.2 Subtract the average CPM of the 0 calibrator tubes from all other average counts to obtain corrected CPM.
- 12.3 Counting times should be sufficient to reduce statistical error (for example, accumulation of 2,000 counts will yield 5% error; 10,000 counts will yield 1% error).

- 12.4 Using log-log graph paper, plot the corrected CPM of each calibrator level on the ordinate against the calibrator concentration on the abscissa.
- 12.5 DiaSorin uses the spline smoothed method of data reduction.
- 12.6 Interpolate the levels of Osteocalcin in the samples from the plot.
- 12.7 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted appropriately with 0 calibrator and assayed again.
- 12.8 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.

13. SAMPLE DATA FOR THE N-TACT® OSTEO SP ASSAY

Typical sample data and a calibrator curve for N-tact® Osteo SP are shown in TABLE I and FIGURE I respectively. This information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

TABLE I
DiaSorin N-tact Osteo SP Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Conc. (ng/mL)
Total Count	307358 306568	306963		
0 Calibrator	282 240	261		
Calibrators (ng/mL) [nmol/L]				
A (1.5) [0.25]	915 1020	968	707	
B (5.0) [0.85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3.39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10.2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33.9]	78471 77768	78120	77859	
Unknown Samples				
1	1057 1081	1069	808	1.88
2	2401 2205	2303	2042	5.66
3	25772 24402	25087	24826	44.00

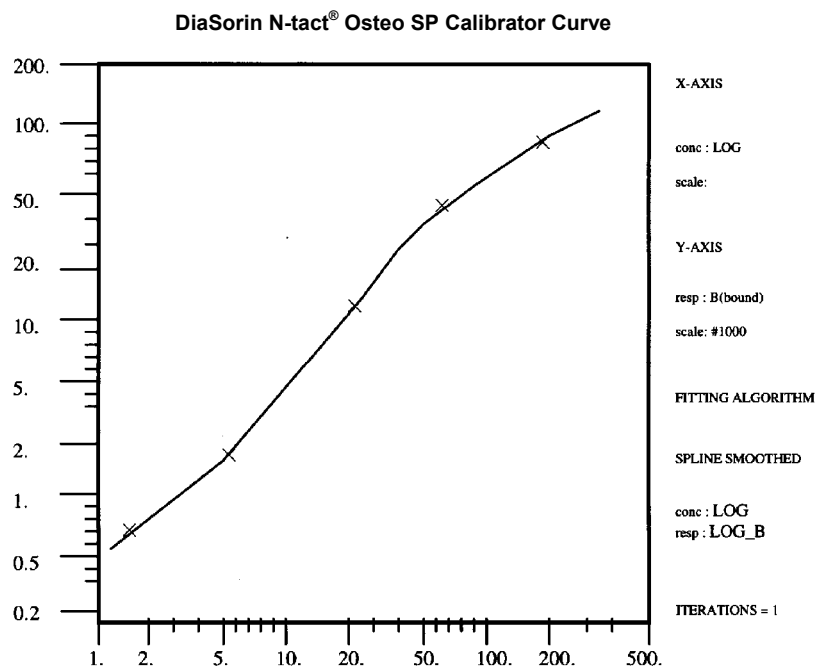


FIGURE 1

14. EXPECTED VALUES

Reference Range

Each laboratory should establish its own reference range. In studies performed by DiaSorin, serum samples from forty-seven apparently healthy adults were collected between the hours of 7 and 10 A.M. The males ranged in age from 23 - 51; the premenopausal females ranged in age from 26 - 50. Analysis of these samples gave the following results:

	GEOMETRIC MEAN (ng/mL)	REFERENCE RANGE (ng/mL)
Males (n = 21)	6.25 [1.05 nmol/L]	3.2-12.2 [0.54-2.07 nmol/L]
Females (n = 26)	5.58 [0.94 nmol/L]	2.7-11.5 [0.46-1.95 nmol/L]

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Analytical Specificity

The DiaSorin N-tact® Osteo SP assay only measures intact human osteocalcin 1-49. The cross-reactivity to human osteocalcin 1-43 is < 0.01%.

15.2 Precision

TABLE III
Within Assay Variation (values = ng/mL)

Intra-Assay Precision

Sample	Mean Value (n = 20)	S.D.	%C.V.
1	2.21	0.14	6.3
2	4.98	0.27	5.4
3	40.76	1.83	4.5

TABLE IV
Between Assay Variation (values = ng/mL)

Inter-Assay Precision

Sample	Mean Value (n = 10)	S.D.	%C.V.
1	2.21	0.20	9.0
2	5.05	0.36	7.1
3	42.10	4.01	9.5

15.3 Trueness: The assay trueness has been checked by the linearity test and the recovery test.

Linearity (Parallelism)

TABLE V
Serial Dilution Study of three Patient Samples (values = ng/mL)

Sample	Undiluted	1/2	1/4	1/8
1	29.2	15.6	7.6	3.8
2	43.1	23.5	12.2	6.0
3	68.3	33.4	16.6	8.6

Accuracy

TABLE VI
Recovery Study of three Patient Samples Spiked with Osteocalcin 1-49 (values = ng/mL)

Sample Number	Added	Value Measured	Percent Recovery
1	0	2.5	100
	9.6	11.9	98
	29.7	30.9	96
	61.4	50.4	78
2	0	4.8	100
	9.6	13.7	93
	29.7	33.2	96
	61.4	62.8	94
3	0	3.1	100
	9.6	12.6	99
	29.7	33.0	101
	61.4	57.2	88

15.4 Analytical Sensitivity

Three tracers (all at eight days post iodination) were used to determine the sensitivity of the assay. The backfit method of analysis was used in which the CPM at 2 standard deviations from the zero calibrator is calculated and this value is read as an unknown off the calibrator line.

Based on the above studies, the sensitivity of the N-tact® Osteo SP kit has been determined to be 0.2 ng/mL (0.034 nmol/L).

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Keep reagents and thawed specimens on ice while setting up the assay.
2. Identify tubes in duplicate.
3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	Cal 0-5	Control and unknown samples
Calibrators	-	20 µL	-
Controls	-	-	20 µL
Unknown samples	-	-	20 µL
Tracer	300 µL	300 µL	300 µL

4. Mix well.
5. Dispense 1 bead to all tubes (EXCEPT the Total Count tubes).
6. Cover the tubes with parafilm, agitate the tubes at 190 +/- 10 rpm for 2 hours +/- 5 minutes at 20-25°C.
7. Aspirate the reaction mixture from each tube except the total count tubes.
8. Wash the beads by vigorously dispensing 1 mL of diluted wash solution into each tube with sufficient force to raise the bead from the bottom of the test tube. Aspirate wash solution. Repeat wash procedure 2 times.
9. Count each tube in a gamma counter.

DOSAGE RADIO-IMMUNOMÉTRIQUE N-TACT[®] OSTEO SP DE L'OSTÉOCALCINE

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*

Cette trousse contient des instructions et des réactifs permettant d'effectuer la détermination quantitative, par dosage radio-immunométrique (IRMA), de l'ostéocalcine humaine intacte 1-49 dans le sérum.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

L'ostéocalcine, une vitamine K-dépendante de 5900 daltons, a été décrite comme une des protéines non collagènes les plus abondantes dans les os. L'ostéocalcine peut représenter jusqu'à 3% des protéines totales des os et contient deux ou trois résidus d'acide aminé de l'acide gamma-carboxyglutamique (GLA), d'où son nom "GLA protéine osseuse" (BGP).¹ BGP ou ostéocalcine est présente uniquement dans les tissus osseux et est produite par l'ostéoblaste.²

On pense qu'elle intervient dans le processus de minéralisation et qu'elle peut être sous l'influence des autres hormones régulatrices du calcium: calcitonine,³ hormone parathyroïdienne et vitamine D.^{4,5,6} Comme il y a une correspondance directe entre les taux d'ostéocalcine et la formation osseuse, son dosage permet de connaître l'état du métabolisme osseux du patient.

Alors que les mesures de phosphatase alcaline et d'hydroxyproline sont largement utilisées comme marqueurs biochimiques pour étudier le métabolisme osseux, elles ne sont pas très utiles car elles ne sont pas spécifiques. Généralement, il y a une corrélation entre l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline, mais il arrive parfois qu'une grande partie de la phosphatase alcaline présente dans le sang ne soit pas d'origine osseuse. Son utilisation comme marqueur spécifique de la vitesse de renouvellement osseux est donc limitée. Par contre, l'ostéocalcine est totalement spécifique des os. On trouve des taux élevés d'ostéocalcine chez les patients souffrant des maladies suivantes: l'ostéomalacie,⁷ la maladie osseuse de Paget,⁸ l'hyperthyroïdie,⁹ l'hyperthyroïdie primitive et l'ostéodystrophie rénale.¹⁰ On trouve des taux élevés d'ostéocalcine dans les cas d'ostéoporose en période de post-ménopause et ces taux varient en fonction de la vitesse de renouvellement osseux qui peut être élevée ou faible.³ On trouve des taux réduits d'ostéocalcine chez les patients souffrant d'hypoparathyroïdie,^{11,12} ou qui suivent une cortico-thérapie prolongée.^{9,13}

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage radio-immunométrique (IRMA) DiaSorin de l'ostéocalcine mesure l'ostéocalcine humaine intacte 1-49 en l'absence de réactivité croisée avec le fragment 1-43. Ce dosage utilise l'ostéocalcine humaine 1-49 comme étalons et contrôles et deux anticorps polyclonaux qui ont été purifiés par chromatographie d'affinité. Ces anticorps purifiés sont spécifiques de deux parties différentes de la molécule d'ostéocalcine. Le premier anticorps, spécifique du domaine amino-terminal de l'ostéocalcine humaine, est fixé à une phase solide (billes de polystyrène). Le deuxième, spécifique du domaine carboxy-terminal de l'ostéocalcine humaine, est marqué à l'iode 125. Les échantillons sont incubés sur un agitateur orbital à température ambiante pendant 2 heures. L'ostéocalcine humaine intacte 1-49 est la seule forme d'ostéocalcine qui sera fixée à la fois par l'anticorps sur la bille et l'anticorps marqué à l'iode 125. Après la période d'incubation, chaque bille est lavée pour éliminer tout anticorps marqué non lié. La radioactivité présente dans l'anticorps marqué lié est alors mesurée à l'aide d'un compteur gamma. La concentration d'ostéocalcine 1-49 présente dans l'échantillon est directement proportionnelle à la radioactivité mesurée.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Étalons 0-5 N-Tact Osteo SP	6 tubes/1,0 mL
Billes N-Tact Osteo SP	1 conteneur/100 billes
¹²⁵ I anticorps N-Tact Osteo SP	3 tubes/11 mL
Solution de lavage concentrée N-Tact Osteo SP	1 tube / 50 mL
Contrôles N-Tact Osteo SP	2 tubes/1,0 mL
Nombre de dosages	100

CONSERVATION: Dès réception, la trousse doit être stockée entre 2 et 8 °C. Stocker tous les réactifs reconstitués à une température inférieure ou égale à -15°C jusqu'à la date de péremption sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Étalons (0-5) N-tact® Osteo SP: réactif lyophilisé

Six étalons d'ostéocalcine humaine 1-49 à des concentrations nominales comprises entre 0 et 200 ng/mL (0,0 nmol/L - 33,9 nmol/L). Reconstituer les étalons avec 1,0 mL d'eau purifiée avant utilisation. Les étalons reconstitués ne doivent pas être congelés puis décongelés plus de deux fois. La trousse DiaSorin N-tact® Osteo SP est étalonnée par analyse quantitative des amino-acides. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé.

4.2 Contrôles N-tact® Osteo SP, niveau 1 et niveau 2: réactif lyophilisé

Du sérum humain tampon décanté contenant du Trasylol à 400 KIU/mL et 0,1% d'azide de sodium dopé avec de l'ostéocalcine humaine 1-49. Reconstituer les contrôles avec 1,0 mL d'eau purifiée avant utilisation. Les contrôles ne doivent pas être congelés puis décongelés plus de deux fois.

4.3 Billes N-tact® Osteo SP: réactif prêt à l'emploi

Les billes de polystyrène sont enduites d'un anticorps de chèvre purifié par affinité et spécifique du domaine amino-terminal de l'ostéocalcine humaine.

4.4 ¹²⁵I traceur N-tact® Osteo SP: réactif prêt à l'emploi

Anticorps de chèvre purifié par affinité, spécifique du domaine carboxy-terminal de l'ostéocalcine humaine marqué à l'iode 125 et dilué dans sérum de chèvre tampon contenant 0,2% d'azide de sodium et 0,2% de sulfate de gentamicine.

4.5 Solution de lavage 10X: réactif concentré

solution 10X concentrée de tampon phosphate et de Tween 20. Diluer dix fois avec de l'eau purifiée avant utilisation.

5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode U.S. agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAG, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquels il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (HBV) ou de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4 mai 1999 ou dernière édition.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 30 μCi (1110 kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, et des centres de recherche et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radiologique. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENTS: Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION: La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

- 6.1** Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.
- 6.2** Diminution de la liaison maximale.
- 6.3** Haute liaison nulle non spécifique.
- 6.4** Doublets faibles.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Vingt microlitres de sérum, en doublet, sont nécessaires pour effectuer les dosages avec la trousse N-tact® Osteo SP. On a remarqué que les taux d'ostéocalcine varient beaucoup dans la journée, un taux maximal étant observé la nuit et un taux minimal en fin de matinée ou début d'après-midi.¹⁴ Il faut donc tenir compte de l'heure de l'échantillonnage lors de l'interprétation des résultats. Prélever le sang par ponction veineuse dans un tube en verre sous vide de 5 ou 10 mL. Laisser le sang coaguler à température ambiante. Centrifuger les échantillons sanguins dans une centrifugeuse réfrigérée pendant quinze minutes pour obtenir du sérum non hémolysé. Séparer rapidement le sérum des cellules et congeler immédiatement. Tous les plastiques, articles en verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés.

Les échantillons peuvent être conservés à -20°C pendant six mois maximum. Pour une conservation plus longue, les échantillons doivent être congelés à une température inférieure ou égale -70°C.

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- 8.1** Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.
- 8.2** Portoir.
- 8.3** Compteur gamma gradué capable de compter l'iode 125.
- 8.4** Vortex.
- 8.5** Pipettes :
 - a.** Micropipette graduée pour distribuer 20 µL.
 - b.** Distributeurs à répétition gradués pour distribuer 300 µl et 1 mL.
 - c.** Pipettes volumétriques pour la reconstitution des contrôles et étalons.
- 8.6** Parafilm ou équivalent pour couvrir les tubes à essai.
- 8.7** Pincettes recouvertes de téflon ou tout autre dispositif agréé pour la trousse pour la manipulation des billes.
- 8.8** Unité d'aspiration pour aspirer l'anticorps marqué à l'iode 125 et la solution de lavage.
- 8.9** Agitateur orbital permettant une agitation à 190 ± 10 tr/min avec un diamètre orbital de 2 cm environ.
- 8.10** Eau purifiée.

9. PROCÉDURE DE DOSAGE

- 9.1** Reconstituer les réactifs lyophilisés et diluer la solution de lavage concentrée 10X (consulter la section Réactifs). Bien mélanger les étalons et contrôles reconstitués. Laisser le traceur et les billes s'équilibrer à température ambiante. Permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Conserver les étalons, contrôles et échantillons décongelés sur de la glace lors de la mise en place des éléments du dosage.
- 9.2** Installer des tubes en verre borosilicaté de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le profil de dosage de la dernière page.

9.3 Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

a. Étalon 0

20 µL d'étalon 0
300 µL de traceur (rouge)

b. Étalons (A-E)

20 µL d'étalon
300 µL de traceur (rouge)

c. Contrôles et échantillons inconnus

20 µL de contrôle ou d'échantillon inconnu
300 µL de traceur (rouge)

d. Tubes de numération totale

300 µL de traceur (rouge)

9.4 Mélanger tous les tubes à l'aide du Vortex.

9.5 Déposer une bille dans chaque tube (À L'EXCEPTION des tubes de numération totale) à l'aide de pinces recouvertes de téflon ou tout autre dispositif approprié pour manipuler les billes. (Ne pas utiliser les doigts.)

9.6 Couvrir les tubes à l'aide d'un parafilm ou équivalent.

9.7 Agiter les tubes sur l'agitateur orbital à 190 ± 10 tr/min pendant 2 heures ± 5 minutes à 20 - 25°C.

9.8 Aspirer le mélange réactionnel de chaque tube (À L'EXCEPTION des tubes de numération totale).

9.9 Laver les billes en ajoutant vigoureusement 1 mL de solution de lavage diluée dans chaque tube (À L'EXCEPTION des tubes de numération totale) de manière à soulever la bille du fond du tube à essai. Aspirer la solution de lavage. Répéter l'opération de lavage encore deux fois.

9.10 Mesurer la radioactivité de chaque tube à l'aide d'un compteur gamma.

10. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

10.1 Doser tous les échantillons en doublet pour garantir la validité des valeurs obtenues.

10.2 Pipeter les échantillons et le traceur dans le tiers inférieur du tube à essai.

10.3 Lors de l'ajout des billes dans les tubes, incliner légèrement le portoir et laisser les billes rouler au fond du tube. On évitera ainsi les éclaboussures de la solution à doser. Ne pas manipuler les billes avec les doigts.

10.4 Pour un mélangeur ayant un diamètre orbital inférieur à 2 cm, régler la vitesse pour obtenir une agitation vigoureuse.

10.5 Pour bien surveiller la précision constante d'un dosage IRMA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère un contrôle des paramètres suivants.

a. Numérations totales

b. % liaison maximale

$$\frac{(\text{CPM de l'étalon E} - \text{CPM de l'étalon 0})}{(\text{CPM des numérations totales} - \text{CPM de l'étalon 0})} \times 100$$

c. Liaison non spécifique

CPM des tubes d'étalon 0

10.6 Pour convertir des ng/mL en nmol/L: $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins un contrôle de haut niveau et un contrôle de bas niveau à chaque dosage pour surveiller la précision du dosage. Les contrôles fournis avec la trousse peuvent être utilisés à cette fin. Les contrôles de la trousse contiennent de l'ostéocalcine à des concentrations élevées et faibles et ont été dosés avec la trousse DiaSorin N-tact® Osteo SP pour établir les intervalles de référence.

La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables. Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus et dosés en doublet. Les dosages sont valides uniquement si les résultats sont conformes aux critères d'acceptabilité du laboratoire.

12. CALCUL DES RÉSULTATS

Pour déterminer la concentration d'ostéocalcine dans les échantillons de contrôle et les échantillons inconnus, préparer une courbe d'échantillonnage en utilisant les concentrations des étalons inscrites sur les étiquettes des tubes. Les valeurs sont obtenues comme suit :

- 12.1** Calculer la CPM moyenne pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.
- 12.2** Soustraire la moyenne des CPM des tubes d'étalon 0 de toutes les autres moyennes des numérations pour obtenir la CPM corrigée.
- 12.3** Les temps de numération doivent être suffisants pour réduire l'erreur statistique (par exemple, l'accumulation de 2 000 numérations donnera une erreur de 5 %; 10 000 numérations donneront une erreur de 1 %).
- 12.4** Sur une feuille de papier bilogarithmique, porter en ordonnée les CPM corrigées de chaque étalon et en abscisse la concentration des étalons.
- 12.5** DiaSorin utilise un programme de traitement de données basé sur la méthode cubique.
- 12.6** Interpoler les concentrations d'ostéocalcine dans les échantillons à l'aide du tracé.
- 12.7** Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé de nouveau.
Si un échantillon inconnu a été dilué, corriger en fonction du facteur de dilution approprié.

13. DONNÉES D'ÉCHANTILLON POUR LE DOSAGE N-TACT[®] OSTEO SP

Les données d'échantillon types et une courbe d'étalonnage pour le dosage N-tact[®] Osteo SP sont présentés dans le Tableau I et la Figure I respectivement. Ces informations sont proposées à titre de référence uniquement et ne peuvent en aucun cas être utilisées pour calculer des valeurs.

TABLEAU I
Données d'échantillon DiaSorin N-tact Osteo SP

Tube	CPM doublet	CPM moyenne	CPM corrigée	Conc. (ng/mL)
Numération totale	307358 306568	306963		
Étalon 0	282 240	261		
Étalons (ng/mL) [nmol/L]				
A (1.5) [0.25]	915 1020	968	707	
B (5.0) [0.85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3.39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10.2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33.9]	78471 77768	78120	77859	
Échantillons inconnus				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25772 24402	25087	24826	44,00

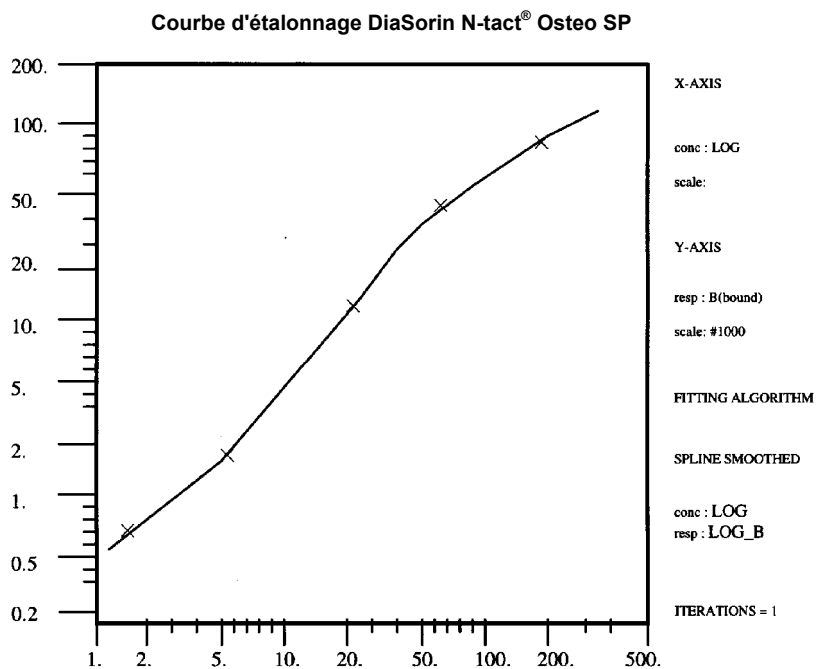


FIGURE 1

14. VALEURS DE REFERENCE

Intervalle de référence

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. Pour ses études, DiaSorin a effectué le dosage à partir d'échantillons de sérum prélevés entre 7 et 10 heures sur quarante-sept adultes apparemment en bonne santé. Les hommes étaient âgés entre 23 et 51 ans ; les femmes en période de préménopause étaient âgées entre 26 et 50. L'analyse de ces échantillons a donné les résultats suivants :

TABLE AU II

	MOYENNE GÉOMÉTRIQUE (ng/mL)	INTERVALLE DE RÉFÉRENCE (ng/mL)
Hommes (n = 21)	6,25 [1,05 nmol/L]	3,2-12,2 [0,54-2,07 nmol/L]
Femmes (n = 26)	5,58 [0,94 nmol/L]	2,7-11,5 [0,46-1,95 nmol/L]

15. CRITÈRES DE QUALITÉ

15.1 Spécificité analytique

Le dosage DiaSorin N-tact® Osteo SP ne mesure que l'ostéocalcine humaine intacte 1-49. La réactivité croisée vis-à-vis de l'ostéocalcine humaine 1-43 est inférieure à 0,01%.

15.2 Précision

TABLEAU III

Variation intra-essai (valeurs = ng/mL)

Précision intra-essai

Échantillon	Valeur moyenne (n = 20)	Écart- type	%C.V.
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

TABLEAU IV

Variation entre les essais (valeurs = ng/mL)

Précision entre les essais

Échantillon	Valeur moyenne (n = 10)	Écart- type	%C.V.
1	2,21	0,20	9,0
2	5,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Exactitude: L'exactitude du dosage a été vérifiée par les tests de linéarité et de récupération.

Linéarité (parallélisme)

TABLEAU V

Étude de dilution en série sur trois échantillons patient (valeurs = ng/mL)

Échantillon	Non dilué	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Exactitude**TABLEAU VI**

Étude de récupération sur trois échantillons patient dopés avec de l'ostéocalcine 1-49 (valeurs = ng/mL)

Numéro échantillon	Quantité ajoutée	Valeur mesurée	Pourcentage de récupération
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Sensibilité analytique

Trois traceurs ont été utilisés (tous huit jours après avoir été marqués à l'iode) pour déterminer la sensibilité du dosage. L'analyse utilisait la méthode de mise en conformité qui consiste à calculer la CPM à 2 écarts-types de l'étalon zéro et à déterminer cette valeur comme une inconnue à l'aide de la courbe d'étalonnage.

En se basant sur les études ci-dessus, on obtenait une sensibilité de la trousse N-tact® Osteo SP kit de 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L).

CONSULTER LA DERNIÈRE PAGE POUR LES RÉFÉRENCES

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Maintenir les réactifs et les échantillons décongelés sur de la glace lors de la mise en place des éléments de dosage.
2. Identifier les tubes en double.
3. Distribuer les réactifs conformément au profil.

Tubes/réactifs	Numérations totales	Étalon 0-5	Contrôle et échantillons inconnus
Étalons	-	20 µL	-
Contrôles	-	-	20 µL
Échantillons inconnus	-	-	20 µL
Traceur	300 µL	300 µL	300 µL

4. Bien mélanger.
5. Déposer une bille dans tous les tubes (sauf les tubes d'activité totale).
6. Couvrir les tubes avec un parafilm, agiter tous les tubes à 190 +/- 10 tr/min pendant 2 heures +/- 5 minutes à 20-25°C.
7. Aspirer le mélange réactionnel de chaque tube à l'exception des tubes de numération totale.
8. Laver les billes en ajoutant vigoureusement 1 mL de solution de lavage diluée dans chaque tube de manière à soulever la bille du fond du tube. Aspirer la solution de lavage. Répéter l'opération de lavage 2 fois.
9. Mesurer la radioactivité de chaque tube à l'aide d'un compteur gamma.

N-TACT[®] OSTEO SP OSTEOCALCIN IMMUNORADIOMETRIC ASSAY

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Dieses Kit enthält Anleitungen und Material für die quantitative Bestimmung von intaktem humanem Osteocalcin 1-49 in Serum mit dem Immunoradiometrie-Assay (IRMA).

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Osteocalcin ist ein Vitamin-K-abhängiges Protein (5900 Dalton) und wurde als eines der im Knochen am meisten vorkommenden nicht-kollagenen Proteine beschrieben. Osteocalcin kann bis zu 3 % der gesamten Knochenproteine ausmachen und enthält drei Aminosäurereste von Gamma-Carboxyglutaminsäure (GLA), daher die Bezeichnung "GLA Knochenprotein" (BGP – Bone GLA Protein).¹ BGP oder Osteocalcin findet sich nur im Knochengewebe und wird von den Osteoblasten erzeugt.²

Es wird angenommen, dass es eine Rolle beim Mineralisationsprozess spielt und dass es von den anderen Hormonen, die den Calcium-Haushalt regulieren, beeinflusst wird: Calcitonin,³ Parathormon und Vitamin D.^{4,5,6} Da die Osteocalcinspiegel eine direkte Folge der Knochenbildung sind, gibt ihre Messung den besten Hinweis auf den aktuellen Zustand des Knochenstoffwechsels des Patienten.

Während Messungen wie die der alkalischen Phosphatase und von L-Hydroxyprolin weitgehend als biochemische Marker für den Knochenstoffwechsel verwendet werden, ist ihr Nutzen als spezifische Marker für Knochenkrankheiten stark eingeschränkt. Im Allgemeinen steht Osteocalcin in Wechselbeziehung zur alkalischen Phosphatase. Gelegentlich hat aber die alkalische Phosphatase im Blut ihren Ursprung nicht in den Knochen. Daher ist ihr Nutzen als spezifischer Marker für den Knochenumsatz beschränkt. Osteocalcin hingegen ist komplett spezifisch für Knochen. Hohe Osteocalcinspiegel zeigen sich bei den folgenden Erkrankungen: Osteomalazie,⁷ Paget-Syndrom des Knochens,⁸ Hyperthyreoidismus,⁹ primärer Hyperparathyreoidismus und renale Osteodystrophie.¹⁰ Osteocalcin findet sich erhöht bei postmenopausaler Osteoporose, je nach Ausmaß des Knochenumsatzes.³ Geringe Osteocalcinspiegel werden bei Hypoparathyreoidismus^{11,12} oder langfristigen Kortisontherapien gemessen.^{9,13}

3. TESTPRINZIP

Beim Osteocalcin Immunoradiometric Assay (IRMA) von DiaSorin wird intaktes humanes Osteocalcin 1-49 ohne Kreuzreaktivität mit dem 1-43-Fragment gemessen. Bei diesem Test kommen humanes Osteocalcin 1-49 für Kalibratoren und Kontrollen sowie zwei polyklonale, durch Affinitätschromatographie gereinigte Antikörper zur Anwendung. Diese gereinigten Antikörper sind für 2 verschiedene Bereiche des Osteocalcinmoleküls spezifisch. Der erste für den N-Terminus des humanen Osteocalcin spezifischen Antikörper ist an eine feste Phase (Polystyrol-Kügelchen) gebunden. Der zweite Antikörper hingegen ist spezifisch für den C-Terminus des humanen Osteocalcin und ist mit ¹²⁵I gekennzeichnet. Die Proben werden auf einen Orbitalschüttler bei Raumtemperatur 2 Stunden lang inkubiert. Das intakte humane Osteocalcin 1-49 ist die einzige Form, die sowohl durch den Antikörper auf dem Kügelchen als auch durch den mit ¹²⁵I gekennzeichneten Antikörper gebunden wird. Nach der Inkubation wird jedes Kügelchen gewaschen, um die ungebundenen markierten Antikörper zu entfernen. Die im verbleibenden gebundenen, markierten Antikörper vorhandene Radioaktivität wird anschließend mit einem Gamma-zintillationszähler gemessen. Dies Konzentration von Osteocalcin 1-49 in der Probe ist direkt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

4. REAGENZIEN DES KITS

N-Tact Osteo SP Kalibratoren 0-5	6 Fläschchen/1,0 mL
N-Tact Osteo SP Kügelchen	1 Behälter/100 Kügelchen
¹²⁵ I N-Tact Osteo SP Antikörper	3 Fläschchen/11 mL
N-Tact Osteo SP konz. Waschlösung	1 Fläschchen/50 mL
N-Tact Osteo SP Kontrollen	2 Fläschchen/1,0 mL
Anzahl der Tests	100

LAGERUNG: Das Kit sollte bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Alle rekonstituierten Reagenzien bis zum Verfallsdatum bei -15 °C oder bei niedrigeren Temperaturen lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 N-tact® Osteo SP Kalibratoren (0-5): Lyophilisiertes Reagenz

Sechs humane-Osteocalcin-1-49-Kalibratoren in Nominalkonzentrationen von 0 bis 200 ng/mL (0,0 nmol/L bis 33,9 nmol/L). Die Kalibratoren müssen vor der Verwendung mit 1,0 mL gereinigtem Wasser rekonstituiert werden. Das N-tact® Osteo SP-Kit von DiaSorin ist durch die quantitative Analyse der Aminosäuren standardisiert. Die Kalibratoren des Kits sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *In-vitro*-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.2 N-tact® Osteo SP Kontrollen, Ebene 1 und Ebene 2: Lyophilisiertes Reagenz

Gepuffertes, gereinigtes Humanserum, das 400 KIU/mL Trasytol und zu 0,1 % Natriumazid enthält, wird mit humanem Osteocalcin 1-49 versetzt. Die Kontrollen müssen mit 1,0 mL gereinigtem Wasser vor der Verwendung rekonstituiert werden. Rekonstituierte Kontrollen dürfen maximal zweimal eingefroren und aufgetaut werden.

4.3 N-tact® Osteo SP Kügelchen: Einsatzbereites Reagenz

Die Polystyrolkügelchen sind mit affinitätschromatographisch gereinigtem, für den N-Terminus von humanem Osteocalcin spezifischen Ziegenantikörper beschichtet.

4.4 ¹²⁵I N-tact® Osteo SP Tracer: Einsatzbereites Reagenz

Affinitätschromatographisch gereinigter, für den C-Terminus von humanem Osteocalcin spezifischer Ziegenantikörper, dotiert mit Jod-125 und verdünnt in gepuffertem Ziegen Serum mit 0,2 % Natriumazid und 0,2 % Gentamycinsulfat.

4.5 10X Waschlösung: Konzentriertes Reagenz

10-fach konzentrierte Waschlösung aus Phosphatpuffer und Tween 20. Vor der Verwendung 10-fach mit gereinigtem Wasser verdünnen.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt als potenziell infektiös behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), des Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des

Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

ACHTUNG: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das ggf. mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidbildung zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" des Handbuchs "Safety Management", Nr. CDC-22, herausgegeben von Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (Georgia), 1976.

Gefahrenbezeichnungen der Europäischen Gemeinschaft für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

R 20/21/22 – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Kontakt mit der Haut.

R 32 – Entwickelt bei Kontakt mit Säure sehr giftige Gase.

S28 – Bei Kontakt mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 30 μCi (1110 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, praktizierenden Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie mit anderen Laborbehältern aus Glas zusammen ausgewaschen werden.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen geringfügig abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während der Beipackzettel die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER REAGENZIEN DES KITS

- 6.1 Eine Verschiebung der Steigung oder Position der Kalibratorkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen.
- 6.2 Eine Abnahme der maximalen Bindung.
- 6.3 Eine hohe nichtspezifische Bindung.
- 6.4 Geringe Duplikatwerte.

7. PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Für den Test mit dem N-tact® Osteo SP-Kit werden 20 µm Serum im Duplikat benötigt. Osteocalcin zeigt eine diurnale Variation mit einem maximalen Spiegel bei Nacht und einem minimalen Spiegel am späten Vormittag oder frühen Nachmittag.¹⁴ Daher ist der Zeitpunkt der Probengewinnung bei der Ergebnisinterpretation zu berücksichtigen. Das Blut durch Venenpunktur in einem evakuierten Glasröhrchen für 5 oder 10 mL sammeln. Das Blut bei Raumtemperatur (15–25 °C) gerinnen lassen. Die Blutproben zur Gewinnung von hämolysefreiem Serum in einer gekühlten Zentrifuge zentrifugieren. Das Serum von den Zellen trennen und sofort einfrieren. Alle Kunststoffteile, Glasteile und sonstige Materialien, die Kontakt mit den Proben haben, müssen frei von jeglichen Verunreinigungen sein.

Die Proben können bei –20 °C bis zu sechs Monate gelagert werden. Für eine längere Lagerung müssen die Proben bei –70 °C eingefroren werden.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 8.1 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 × 75 mm
- 8.2 Röhrchenständer
- 8.3 Kalibrierter Gammazintillationszähler zur Auszählung des radioaktiven Jods 125.
- 8.4 Schüttelmischer
- 8.5 Pipettiergeräte:
 - a. Mikropipettoren, kalibriert zur Abgabe von 20 µL.
 - b. Mehrfachspender, kalibriert zur Abgabe von 300 µL und 1 mL.
 - c. Messpipetten zur Rekonstitution von Kontrollen und Kalibratoren
- 8.6 Parafilm oder gleichwertige Abdeckung für Teströhrchen
- 8.7 Teflonbeschichtete Pinzette oder anderes Kit-zulässiges Instrument zur Abgabe der Kügelchen
- 8.8 Aspirationsgerät zum Absaugen des ¹²⁵I-Antikörpers und der Waschlösung.
- 8.9 Orbitalschüttler für eine Drehzahl von 190 ± 10 U/min mit einem ungefähren Umlaufdurchmesser von 2 cm.
- 8.10 Gereinigtes Wasser

9. TESTVERFAHREN

- 9.1 Die lyophilisierten Reagenzien rekonstitutionieren und die 10-fach konzentrierte Waschlösung verdünnen (siehe Abschnitt Reagenzien des Kits). Die rekonstitutionierten Kalibratoren und Kontrollen gründlich mischen. Den Tracer und die Kügelchen auf Raumtemperatur bringen. Gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Die Kalibratoren, Kontrollen und die aufgetauten Proben während der Testvorbereitungen auf Eis belassen.
- 9.2 Die beschrifteten Einweg-Glasröhrchen 12 × 75 mm entsprechend dem Testschema auf der letzten Seite in doppelter Ausführung aufstellen.

- 9.3** Die Reagenzien wie folgt zugeben:
- a. Nullkalibrator**
20 µL Nullkalibrator
300 µL Tracer (rot)
 - b. Kalibratoren (A-E)**
20 µL Kalibrator
300 µL Tracer (rot)
 - c. Kontrollen und unbekannte Proben**
20 µL Kontrolle oder unbekannte Probe
300 µL Tracer (rot)
 - d. Röhrrchen für die Gesamtzählung**
300 µL Tracer (rot)
- 9.4** Alle Röhrrchen schütteln.
- 9.5** Ein Kügelchen mit der Teflon-beschichteten Pinzette oder einem anderen geeigneten Instrument zur Abgabe von Kügelchen in jedes Röhrrchen (AUSSER das Röhrrchen für die Gesamtzählung) geben. (Nicht mit den Fingern!)
- 9.6** Die Röhrrchen mit Parafilm oder gleichwertigem Material abdecken.
- 9.7** Die Röhrrchen 2 Stunden lang \pm 5 Minuten mit einem Orbitalschüttler für 190 ± 10 U/min bei 20–25 °C schütteln.
- 9.8** Die Reaktionsmischung aus jedem Röhrrchen (AUSSER dem Röhrrchen für die Gesamtzählung) absaugen.
- 9.9** Die Kügelchen waschen. Dazu 1 mL der verdünnten Waschlösung mit so viel Kraft in jedes Röhrrchen (AUSSER in das Gesamtzählungsröhrrchen) einfüllen, dass das Kügelchen vom Boden des Teströhrrchens hochgehoben wird. Die Waschlösung absaugen. Das Waschverfahren noch weitere zwei Mal durchführen.
- 9.10** Die in jedem Röhrrchen vorhandene Radioaktivität mit dem Gamma-szintillationszähler messen.
- 10. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN**
- 10.1** Alle Proben in doppelter Ausführung testen, um die gemessenen Werte zu bestätigen.
- 10.2** Die Proben und Tracer in das untere Drittel des Teströhrrchens pipettieren.
- 10.3** Bei der Zugabe der Kügelchen in die Teströhrrchen den Röhrrchenständer etwas neigen und die Kügelchen in die Röhrrchen hineinrollen lassen. Dadurch wird übermäßiges Verspritzen der Testlösung vermieden. Die Kügelchen nicht mit den Fingern berühren.
- 10.4** Bei einem Schüttler mit einem Umlaufdurchmesser, der kleiner als 2 cm ist, die Geschwindigkeit für einen kräftigen Schüttelvorgang entsprechend einstellen.
- 10.5** Für die vollständige Überwachung der konsistenten Leistung eines IRMA müssen weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt eine regelmäßige Überprüfung der folgenden Parameter.
- a. Insgesamt gezählte Impulse**
 - b. % Maximale Bindung**
$$\frac{(\text{CPM des E-Kalibrators} - \text{CPM des Nullkalibrators})}{(\text{CPM der gesamt gezählten Impulse} - \text{CPM des Nullkalibrators})} \times 100$$
 - c. Nichtspezifische Bindung**
CPM der Nullkalibratorröhrrchen
- 10.6** Für die Umrechnung von ng/mL in nmol/L; $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss in jedem Test mindestens eine hohe und eine niedrige Kontrolle einsetzen, um die Leistung des Kits zu überwachen. Dazu können die im Kit enthaltenen Kontrollen verwendet werden. Die Kontrollen dieses Kits enthalten Osteocalcin in hoher und niedriger Konzentration und wurden mit dem N-tact® Osteo SP-Kit von DiaSorin getestet, um die Sollbereiche zu bestimmen. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können. Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt und doppelt getestet werden. Die Testergebnisse können erst als gültig betrachtet werden, wenn sie den Akzeptibilitätskriterien des Labors entsprechen.

12. ERGEBNISBERECHNUNG

Zur Bestimmung der Konzentration von Osteocalcin in Kontrollen und unbekanntem Proben wird eine Kalibratorkurve mit der auf dem Fläschchenetikett angegebenen Kalibratorkonzentration erstellt. Die Werte werden wie folgt ermittelt:

- 12.1** Die durchschnittliche CPM für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe ermitteln.
- 12.2** Die durchschnittliche CPM des Nullkalibrators von allen durchschnittlichen Zählungen subtrahieren, um den korrekten Wert für die CPM zu erhalten.
- 12.3** Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um statistische Fehler zu reduzieren (2000 Zählungen ergeben z. B. 5 % Fehler; 10.000 Zählungen ergeben 1 % Fehler).
- 12.4** Auf logarithmischem Millimeterpapier den berichtigten CPM-Wert jeder Kalibratorstufe auf der Ordinate gegen die Kalibratorkonzentration auf der Abszisse auftragen.
- 12.5** DiaSorin verwendet die geglättete Spline-Kurve zur Datenreduktion.
- 12.6** Die Osteocalcinspiegel der Proben aus der grafischen Darstellung interpolieren.
- 12.7** Wenn die Werte einer unbekanntem Probe größer sind als die größten Kalibratorwerte, die unbekanntem Probe entsprechend mit Nullkalibrator verdünnen und neu testen.
- 12.8** Wenn eine unbekanntem Probe verdünnt wurde, den Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigieren.

13. PROBENDATEN FÜR DEN N-TACT® OSTEO SP-TEST

Die typischen Probendaten und eine Kalibratorokurve für N-tact® Osteo SP sind in TABELLE I und ABBILDUNG I dargestellt. Diese Informationen dienen nur als Referenz und dürfen nicht zur Berechnung von Werten verwendet werden.

TABELLE I
DiaSorin N-tact Osteo SP-Probendaten

Röhrchen	Doppelt best. CPM	Durchschn. CPM	Korrig. CPM	Konz. (ng/mL)
Gesamte gezählte Impulse	307.358	306.963		
Nullkalibrator	306568 282 240	261		
Kalibratoren (ng/mL) [nmol/L]				
A (1,5) [0,25]	915 1020	968	707	
B (5,0) [0,85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3,39]	10623 10226	10.425	10.164	
D (60) [10,2]	33.102 33775	33.438	33.177	
E (200) [33,9]	78.471 77.768	78.120	77.859	
Unbekannte Proben				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25.772 24402	25.087	24.826	44,00

DiaSorin N-tact® Osteo SP-Kalibratorkurve

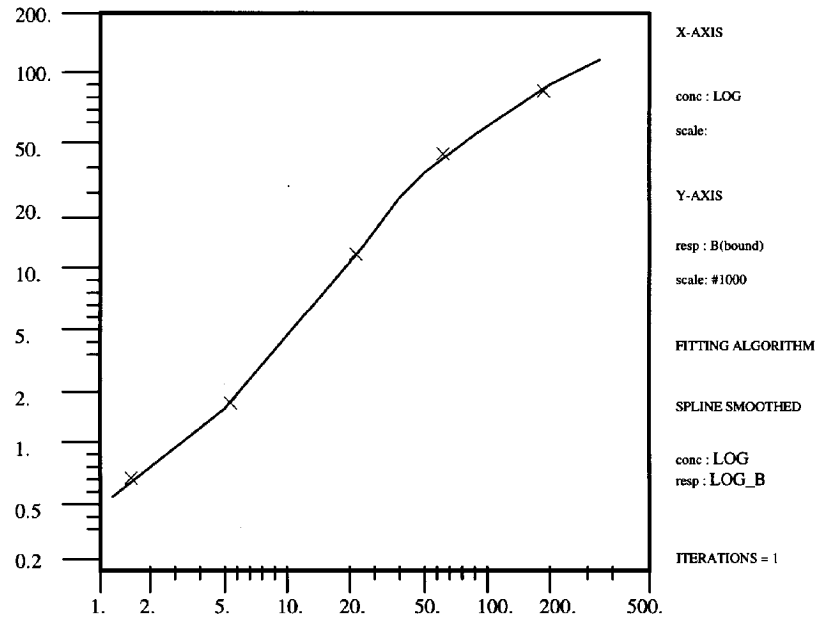


ABBILDUNG 1

14. ERWARTETE WERTE

Referenzbereich

Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich festlegen. In von DiaSorin durchgeführten Studien wurden 47 gesunden Erwachsenen Serumproben zwischen 7.00 und 10.00 Uhr entnommen. Die Männer waren zwischen 23 und 51 Jahre alt; die prämenopausalen Frauen waren zwischen 26 und 50 Jahre alt. Bei der Analyse dieser Proben kam es zu den folgenden Ergebnissen:

TABELLE II

	GEOMETRISCHES MITTEL (ng/mL)	REFERENZBEREICH (ng/mL)
Männer (n = 21)	6,25 [1,05 nmol/L]	3,2-12,2 [0,54-2,07 nmol/L]
Frauen (n = 26)	5,58 [0,94 nmol/L]	2,7-11,5 [0,46-1,95 nmol/L]

15. TESTCHARAKTERISTIKA

15.1 Analytische Spezifität

Der N-tact® Osteo SP-Test von DiaSorin misst nur das intakte humane Osteocalcin 1-49. Die Kreuzreaktivität zum humanen Osteocalcin 1-43 ist < 0,01 %.

15.2 Wiederholgenauigkeit

TABELLE III
Inter-Assay-Variation (Werte = ng/mL)

Intra-Assay-Präzision			
Probe	Mittelwert (n = 20)	SA	%VK
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

TABELLE IV
Intra-Assay-Variation (Werte = ng/mL)

Inter-Assay-Präzision			
Probe	Mittelwert (n = 10)	SA	%VK
1	2,21	0,20	9,0
2	5,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Richtigkeit: Die Richtigkeit des Tests wurde durch Linearitätstest und Wiederfindungstest überprüft.

Linearität (Parallelität)

TABELLE V
Serienverdünnung von 3 Patientenproben (Werte = ng/mL)

Probe	Unverdünnt	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Genauigkeit

TABELLE VI
Wiederfindungsstudie von 3 Patientenproben, versetzt mit Osteocalcin 1-49
(Werte = ng/mL)

Probennummer	Hinzugefügt	Gemessener Measured	Prozent Wiederfindung
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Analytische Sensitivität

Es wurden drei Tracer (alle acht Tage nach Jodisation) zur Sensitivitätsbestimmung des Tests verwendet. Die Backfitting-Analyse wurde verwendet. Dabei wird CPM bei zwei Standardabweichungen vom Nullkalibrator berechnet und Wert als eine Unbekannte von der Kalibratorkurve abgelesen.

Basierend auf den oben beschriebenen Studien wurde die Sensitivität des N-tact® Osteo SP-Kits bei 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L) festgelegt.

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Reagenzien und aufgetaute Proben während der Testvorbereitungen auf Eis belassen.
2. Die Röhrrchen in doppelter Anordnung aufstellen.
3. Die Reagenzien wie folgt zugeben:

Röhrrchen/ Reagenzien	Gesamtzählung	Kal. 0-5	Kontrollen und unbekannte proben
Kalibratoren	-	20 µL	-
Kontrollen	-	-	20 µL
Unbekannte Proben	-	-	20 µL
Tracer	300 µL	300 µL	300 µL

4. Gut mischen.
5. In alle Röhrrchen (außer die Röhrrchen für die Gesamtzählung) ein Kügelchen geben.
6. Die Röhrrchen mit Parafilm abdecken und mit 190 +/- 10 U/min 2 Stunden lang +/- 5 Minuten bei 20–25 °C schütteln.
7. Die Reaktionsmischung aus jedem Röhrrchen (außer dem Röhrrchen für die Gesamtzählung) absaugen.
8. Die Kügelchen waschen. Dazu 1 mL Waschlösung so zügig in jedes Röhrrchen füllen, dass das Kügelchen vom Boden des Teströhrrchens angehoben wird. Die Waschlösung absaugen. Diesen Waschvorgang noch zweimal wiederholen.
9. Jedes Röhrrchen in einem Gammazintillationszähler zählen.

ENSAYO INMUNORRADIOMÉTRICO N-TACT[®]
OSTEO SP PARA OSTEOCALCINA

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

Este equipo contiene instrucciones y materiales para la determinación cuantitativa de la osteocalcina humana intacta 1-49 en suero mediante ensayo inmunorradiométrico (IRMA).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La osteocalcina es una proteína dependiente de la vitamina K de 5900 dalton que se ha descrito como una de las proteínas no de colágeno más abundantes en los huesos. La osteocalcina puede suponer hasta un 3% de la proteína total del hueso y contiene dos o tres residuos de ácido carboxiglutámico gamma (GLA), de ahí su designación como proteína GLA ósea (BGP).¹ La BGP, o osteocalcina, sólo se encuentra en el tejido óseo y se sabe que es un producto del osteoblasto.²

Se cree que desempeña un papel en el proceso de mineralización y está bajo la influencia de otras hormonas reguladoras del calcio: calcitonina, ³ hormona paratiroidea y vitamina D.^{4,5,6} Dado que los niveles de osteocalcina son un reflejo directo de la formación ósea, su medida se relaciona estrechamente con el estado real del metabolismo óseo del paciente.

Aunque mediciones como las de fosfatasa alcalina e hidroxipolina se han utilizado ampliamente como marcadores bioquímicos del metabolismo óseo, presentan importantes limitaciones en cuanto a su utilidad porque tienden a ser inespecíficas. Por lo general, la osteocalcina se correlaciona con la fosfatasa alcalina, pero ocasionalmente una gran parte de la fosfatasa alcalina de la sangre puede ser de origen no óseo. Este hecho limita su utilidad como marcador específico del recambio metabólico óseo. La osteocalcina, sin embargo, es completamente específica de los huesos. Se ha encontrado osteocalcina elevada en las enfermedades siguientes: osteomalacia,⁷ osteítis deformante,⁸ hiperparatiroidismo,⁹ hiperparatiroidismo primario y osteodistrofia renal.¹⁰ La osteocalcina es variablemente elevada en la osteoporosis postmenopáusica dependiendo de si el recambio metabólico óseo es alto o bajo.³ Se han encontrado niveles reducidos de osteocalcina en hipoparatiroidismo,^{11,12} o terapia de corticoesteroides a largo plazo.^{9,13}

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo inmunorradiométrico (IRMA) para osteocalcina de DiaSorin mide la osteocalcina humana intacta 1-49 sin reactividad cruzada con el fragmento 1-43. El ensayo utiliza la osteocalcina humana 1-49 como calibradores y controles y dos anticuerpos policlonales diferentes que se han purificado usando cromatografía de afinidad. Estos anticuerpos purificados son específicos para dos regiones distintas de la molécula de osteocalcina. El primer anticuerpo, específico del término amino de la osteocalcina humana, está unido a una fase sólida (glóbulos de poliestireno). El segundo anticuerpo es específico del término carboxi de la osteocalcina humana y se marca con ¹²⁵I. Las muestras se incuban en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 2 horas. La osteocalcina humana intacta 1-49 es la única forma de osteocalcina que se une tanto con el anticuerpo del glóbulo como con el anticuerpo marcado con ¹²⁵I. Después del período de incubación, se lava cada glóbulo para retirar el anticuerpo marcado no unido. Luego, se mide la radiactividad presente en el anticuerpo marcado unido restante usando un contador gamma. La concentración de osteocalcina 1-49 presente en la muestra es directamente proporcional a la radiactividad medida.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibradores 0-5 N-Tact osteo SP	6 viales/1,0 mL
Glóbulos N-Tact osteo SP	1 contenedor/100 glóbulos
Anticuerpo ¹²⁵ I N-Tact osteo SP	3 viales/11 mL
Conc. de solución de lavado N-Tact osteo	1 vial/50 mL
Controles N-Tact osteo SP	2 viales/1,0 mL
Número de pruebas	100

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8 °C. Almacene todos los reactivos reconstituidos a -15° C o menos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad.

Quando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibradores N-tact® osteo SP (0-5): reactivo liofilizado

Seis calibradores de osteocalcina humana 1-49, con concentraciones nominales de 0 a 200 ng/mL (0,0 nmol/L - 33,9 nmol/L). Los calibradores se deben reconstituir con 1,0 mL de agua purificada antes de utilizarlos. Los calibradores reconstituidos no deben someterse a más de dos descongelaciones. El equipo N-tact® osteo SP de DiaSorin se estandariza mediante análisis cuantitativo de aminoácidos. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico *in vitro*.

4.2 Controles N-tact® osteo SP, nivel 1 y nivel 2: reactivo liofilizado

Suero humano tamponado clarificado con Trasylol a 400 KIU/mL y azida sódica al 0,1% inyectada con osteocalcina humana 1-49. Los controles se deben reconstituir con 1,0 mL de agua purificada antes de utilizarlos. Los calibradores reconstituidos no deben someterse a más de dos descongelaciones.

4.3 Glóbulos N-tact® osteo SP: reactivo listo para su uso

Glóbulos de poliestireno recubiertos de anticuerpo de cabra purificado por afinidad específico del término amino de la osteocalcina humana.

4.4 Trazador ¹²⁵I N-tact® osteo SP: reactivo listo para su uso

Anticuerpo de cabra purificado por afinidad específico del término carboxi de la osteocalcina humana, marcado con yodo 125 y diluido en suero de cabra tamponado con azida sódica al 0,2% y sulfato de gentamicina al 0.2%.

4.5 Solución de lavado 10X: reactivo concentrado

Concentrado 10X de tampón de fosfato y Tween 20. Debe diluirse a diez veces con agua purificada antes de su uso.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátelos como sustancias potencialmente infecciosas.

Todas las unidades de suero/plasma de donante usados en la preparación de este producto se han comprobado mediante métodos aprobados por la FDA estadounidense, demostrando no ser reactivos para la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no puede garantizarse que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manipular de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas y tomando las precauciones adecuadas, según se describe en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª edición, mayo de 1999 o edición actual, de los centros de control y prevención de enfermedades/institutos nacionales de salud de EE.UU.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlos, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," en el manual Guide-Safety Management N° CDC-22, publicado por los centros de control y prevención de enfermedades, Atlanta, GA, 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

R20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO 125

Este equipo contiene material radiactivo que no supera los 30 μCi (1110 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su irradiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la comisión reguladora nuclear de EE.UU. o del estado con el que dicha comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No utilice la boca al dosificar el material radiactivo con pipeta.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.

5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjuagarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, el uso, la transferencia y la eliminación de materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de cada licencia específica.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS

- 6.1 Desviación en la pendiente o posición de la curva de calibración con respecto al resultado habitual.
- 6.2 Disminución de la unión máxima.
- 6.3 Unión cero no específica alta
- 6.4 Valores duplicados deficientes.

7. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se requieren veinte microlitros de suero, por duplicado, para su uso con el equipo N-tact® osteo SP.

La osteocalcina exhibe una marcada variación diurna con un nivel máximo por la noche y uno mínimo al final de la mañana o al comienzo de la tarde.¹⁴ Por ello, debe tenerse en cuenta la hora a la que se han tomado las muestras al interpretar los resultados. Recoja sangre por punción venosa en un tubo de vidrio evacuado de 5 ó 10 mL. Deje que la sangre se coagule a temperatura ambiente. Centrifugue las muestras de sangre durante quince minutos en una centrifugadora refrigerada para obtener suero no hemolizado. Separe el suero de las células y congélelo inmediatamente. Todos los materiales de plástico, vidrio u otro tipo que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación.

Las muestras pueden almacenarse a -20 °C hasta 6 meses. Para almacenarlas durante más tiempo, deben conservarse a -70 °C o menos.

8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 8.1 Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.
- 8.2 Gradilla para tubos de ensayo.
- 8.3 Contador gamma calibrado válido para yodo 125.
- 8.4 Mezclador vórtex.
- 8.5 Dispositivos de dosificación:
 - a. Micropipetador calibrado para dosificar 20 µL.
 - b. Dispensadores repetitivos, calibrados para dispensar 300 µL y 1 mL.
 - c. Pipetas volumétricas para reconstituir controles y calibradores.
- 8.6 Parafilm o un equivalente para tapar los tubos de ensayo.
- 8.7 Fórceps revestidos con teflón u otro dispositivo aprobado para el equipo para dispensar los glóbulos.

- 8.8 Unidad de aspiración para aspirar el anticuerpo ¹²⁵I y la solución de lavado.
- 8.9 Agitador orbital con capacidad de 190 ± 10 rpm y un diámetro aproximado de 2 cm.
- 8.10 Agua purificada.

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- 9.1 Reconstituya los reactivos liofilizados y diluya la solución de lavado 10X (consulte la sección Reactivos). Mezcle bien los controles y calibradores reconstituidos. Deje que el trazador y los glóbulos se equilibren a temperatura ambiente. Deje que se descongelen por completo las muestras congeladas. Mantenga los calibradores, controles y muestras descongeladas en hielo mientras organiza el ensayo.
- 9.2 Organice tubos de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm etiquetados por duplicado de acuerdo con el programa del ensayo de la última página.
- 9.3 Agregue reactivos a los tubos como sigue:
 - a. **Calibrador 0**
20 µL de calibrador 0
300 µL de trazador (rojo)
 - b. **Calibradores (A-E)**
20 µL de calibrador
300 µL de trazador (rojo)
 - c. **Controles y muestras desconocidas**
20 µL de control o muestra desconocida
300 µL de trazador (rojo)
 - d. **Tubos de cuentas totales**
300 µL de trazador (rojo)
- 9.4 Mezcle todos los tubos en el mezclador vórtex.
- 9.5 Dispense un glóbulo en cada tubo (EXCEPTO los tubos de cuentas totales) utilizando fórceps revestidos con teflón o un dispensador adecuado para glóbulos (no emplee los dedos).
- 9.6 Tape los tubos con parafilm o un equivalente.
- 9.7 Agite los tubos en un agitador orbital a 190 ± 10 rpm durante 2 horas ± 5 minutos a 20 - 25 °C.
- 9.8 aspire la mezcla de reacción de cada tubo (EXCEPTO los tubos de cuentas totales).
- 9.9 Lave los glóbulos dispensando enérgicamente 1 mL de solución de lavado diluida en cada tubo (EXCEPTO los tubos de cuentas totales) con fuerza suficiente como para elevar el glóbulo desde el fondo del tubo de ensayo. aspire la solución de lavado. Repita dos veces más el procedimiento de lavado.
- 9.10 Mida la radiactividad presente en cada tubo con un contador gamma.

10. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- 10.1 Analice todas las muestras por duplicado para garantizar la obtención de valores fiables.
- 10.2 Dosifique las muestras y el trazador en el tercio inferior del tubo de ensayo.
- 10.3 Cuando agregue glóbulos a los tubos de ensayo, incline levemente la gradilla para que los glóbulos entren rodando en los tubos. Así evitará que la solución de prueba salpique demasiado. No manipule los glóbulos con los dedos.
- 10.4 Para un agitador con un diámetro orbital inferior a 2 cm, ajuste la velocidad de forma adecuada para lograr un agitado enérgico.

10.5 Para asegurar completamente un resultado fiable del ensayo IRMA, deben comprobarse varios factores adicionales. DiaSorin recomienda comprobar los siguientes parámetros.

a. Cuentas totales

b. % de unión máxima

$$\frac{(\text{CPM del calibrador E} - \text{CPM del calibrador 0})}{(\text{CPM de cuentas totales} - \text{CPM del calibrador 0})} \times 100$$

c. Uniones inespecíficas

CPM de los tubos de calibrador 0

10.6 Para convertir ng/mL a nmol/L; $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos un control de nivel alto y otro de nivel bajo en cada ensayo para supervisar sus resultados. Para ello pueden utilizarse controles que se suministran con el equipo. Los controles del equipo contienen osteocalcina en concentraciones tanto altas como bajas, y se han analizado con el equipo N-tact® osteo SP de DiaSorin para establecer valores previstos. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables. Los controles deben tratarse como muestras desconocidas y analizarse por duplicado. Los ensayos deben considerarse válidos sólo si los resultados cumplen los criterios de aceptabilidad del laboratorio.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Para determinar la concentración de osteocalcina en las muestras desconocidas y de control, se prepara una curva de calibración utilizando las concentraciones de calibrador indicadas en las etiquetas de los viales. Los valores se generan como sigue:

- 12.1** Calcule el promedio de CPM de cada calibrador, control y muestra desconocida.
- 12.2** Reste el promedio de CPM de los tubos de calibrador 0 a todas las demás cuentas promedio para obtener las CPM corregidas.
- 12.3** La frecuencia de las cuentas debe ser suficiente como para reducir errores estadísticos (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%; 10.000 CPM dará como resultado un 1% de error).
- 12.4** Usando papel gráfico log-log, trace las CPM corregidas de cada nivel de calibrador en la ordenada contra la concentración del calibrador en la abscisa.
- 12.5** DiaSorin utiliza el método de curva spline suavizada para la reducción de los datos.
- 12.6** Interpole los niveles de osteocalcina de las muestras a partir del gráfico.
- 12.7** Si la lectura de cualquiera de las muestras desconocidas es mayor que la del calibrador más alto, deberá diluirse correctamente con calibrador 0 y analizarse de nuevo.
- 12.8** Si se ha diluido una muestra desconocida, corríjala para obtener el factor de dilución adecuado.

13. DATOS DE MUESTRAS DEL ENSAYO N-TACT[®] OSTEO SP

Los datos de muestras y la curva de calibración típicos de N-tact[®] osteo SP pueden verse en la TABLA I y la FIGURA I, respectivamente. Esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

TABLA I
Datos de muestras de N-tact osteo SP

Tubo	CMP duplicadas	Promedio de CPM	CPM corregidas	Conc. (ng/mL)
Cuentas totales	307358	306963		
	306568			
Calibrador 0	282	261		
	240			
Calibradores (ng/mL) [nmol/L]				
A (1.5) [0.25]	915 1020	968	707	
B (5.0) [0.85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3.39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10.2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33.9]	78471 77768	78120	77859	
Muestras desconocidas				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25772 24402	25087	24826	44,00

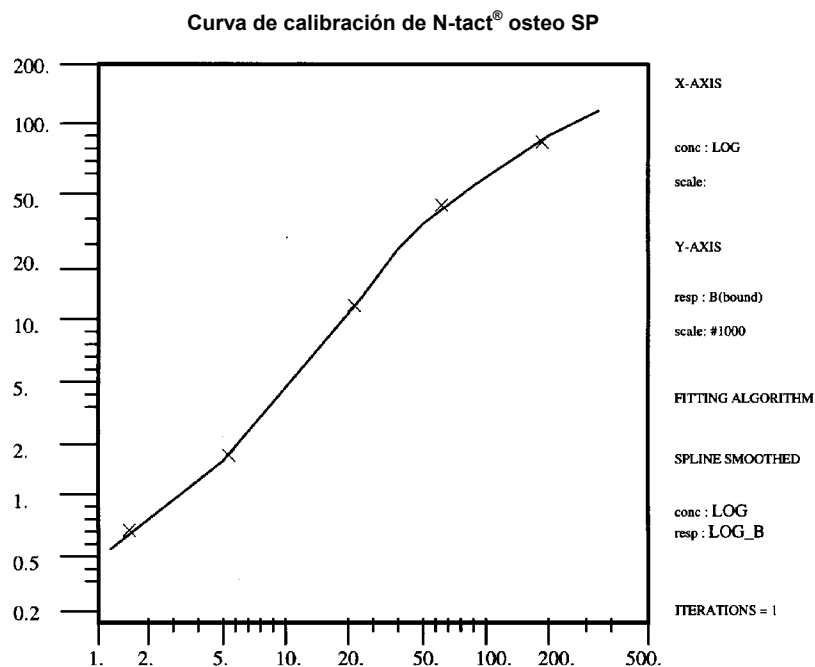


FIGURA 1

14. VALORES PREVISTOS

Rango de referencia

Cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia. En estudios realizados por DiaSorin se recogieron muestras de suero obtenidas de cuarenta y siete individuos aparentemente sanos entre las 7 y las 10 A.M. El rango de edades de los hombres era de 23 - 51; el rango de mujeres premenopáusicas era de 26 - 50. Los análisis de estas muestras dieron los siguientes resultados:

TABLA II

	MEDIA GEOMÉTRICA (ng/mL)	RANGO DE REFERENCIA (ng/mL)
Hombres (n = 21)	6.25 [1.05 nmol/L]	3.2-12.2 [0.54-2.07 nmol/L]
Mujeres (n = 26)	5.58 [0.94 nmol/L]	2.7-11.5 [0.46-1.95 nmol/L]

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RESULTADO

15.1 Especificidad analítica

El ensayo N-tact® osteo SP sólo mide la osteocalcina humana intacta 1-49. La reactividad cruzada con la osteocalcina humana 1-43 es < 0,01%.

15.2 Precisión

TABLA III
Variación intraensayo (valores = ng/mL)

Precisión intraensayo			
Muestra	Valor medio (n = 20)	D.E.	%C.V.
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

TABLA IV
Variación interensayo (valores = ng/mL)

Precisión interensayo			
Muestra	Valor medio (n = 10)	D.E.	%C.V.
1	2,21	0,20	9,0
2	5,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Veracidad: la veracidad del ensayo se ha comprobado con la prueba de linealidad y la de recuperación.

Linealidad (paralelismo)

TABLA V
Estudio de dilución en serie de tres muestras de paciente (valores = ng/mL)

Muestra	Sin diluir	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Exactitud

TABLA VI
Estudio de recuperación de tres muestras de paciente inyectadas con osteocalcina 1-49 (valores = ng/mL)

Número de muestra	Añadido	Valor medido	Porcentaje de recuperación
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Sensibilidad analítica

Se utilizaron tres trazadores (todos ocho días después del marcado con yodo) para determinar la sensibilidad del ensayo. Se utilizó el método de análisis por ajuste posterior en el que se calculan las CPM a 2 desviaciones estándares respecto del calibrador cero y se lee este valor como muestra desconocida en la línea del calibrador.

A partir de los estudios mencionados se determinó que la sensibilidad del equipo N-tact® osteo SP era de 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L).

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

PROGRAMA DEL ENSAYO

1. Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados que hubiera. Mantenga a los reactivos y especímenes descongelados en hielo mientras organiza el ensayo.
2. Identifique los tubos por duplicado.
3. Dispense los reactivos según el siguiente programa:

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	Cal. 0-5	Controles y muestras desconocidas
Calibradores	-	20 µL	-
Controles	-	-	20 µL
M. desconocidas	-	-	20 µL
Trazador	300 µL	300 µL	300 µL

4. Mezcle bien los reactivos.
5. Dispense 1 glóbulo en todos los tubos (EXCEPTO los tubos de cuentas totales).
6. Cubra los tubos con parafilm y agítelos a 190 +/- 10 rpm durante 2 horas (+/- 5 minutos) a 20-25 °C.
7. Aspire la mezcla de reacción de cada tubo, excepto los tubos de cuentas totales.
8. Lave los glóbulos enérgicamente dispensando 1 mL de solución de lavado en cada tubo con fuerza suficiente como para elevar el glóbulo desde el fondo del tubo de ensayo. Aspire la solución de lavado. Repita el procedimiento de lavado 2 veces.
9. Cuento cada tubo en un contador gamma.

ANALISI IMMUNORADIOMETRICA PER L'OSTEOCALCINA N-TACT[®] OSTEO SP

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Questo kit contiene istruzioni e materiali per la determinazione quantitativa di osteocalcina umana intatta 1-49 nel siero mediante analisi immunoradiometrica (IRMA).

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

L'osteocalcina è una proteina vitamina K dipendente di 5900 dalton, descritta come una delle proteine più abbondanti non collagenose nelle ossa. L'osteocalcina può costituire fino al 3% delle proteine totali delle ossa e contiene tre residui di aminoacidi dell'acido GLA (acido gamma carbossiglutamico), da cui deriva la designazione di "proteina GLA delle ossa".¹ La BGP, o osteocalcina, si trova solo nel tessuto osseo ed è nota come prodotto dagli osteoblasti.²

Si ritiene svolga un ruolo nel processo di mineralizzazione, sotto l'influenza di altri ormoni regolatori del calcio: calcitonina,³ ormone paratiroide e vitamina D.^{4,5,6} Poiché i livelli di osteocalcina sono uno specchio diretto della formazione ossea, la loro misurazione è collegata allo stato effettivo del metabolismo osseo del paziente.

Mentre alcuni elementi di misurazione come la fosfatasi alcalina e l'idrossiprolina sono stati ampiamente utilizzati come marcatori biochimici per il metabolismo osseo, il loro impiego è stato significativamente limitato, in quanto tendono ad essere marcatori non specifici. Di solito l'osteocalcina è collegata alla fosfatasi alcalina; tuttavia, a volte, la maggior parte della fosfatasi alcalina nel sangue può essere di origine non ossea. Ciò ne limita l'utilità come marcatore del metabolismo osseo. L'osteocalcina è tuttavia completamente specifica per le ossa. Elevati contenuti di osteocalcina sono stati riscontrati nelle seguenti malattie: osteomalacia,⁷ malattia ossea di Paget,⁸ ipertiroidismo,⁹ iperparatiroidismo primario e osteodistrofia renale.¹⁰ La percentuale di osteocalcina è variabilmente elevata nell'osteoporosi post-menopausa a seconda che vi sia un metabolismo osseo elevato o limitato.³ Livelli ridotti di osteocalcina sono riscontrati nell'ipoparatiroidismo,^{11,12} o nella terapia con corticosteroidi a lungo termine.^{9,13}

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi immunoradiometrica IRMA DiaSorin sull'osteocalcina misura l'osteocalcina umana intatta 1-49 senza reattività incrociata sul frammento 1-43. Questa analisi utilizza osteocalcina umana 1-49 per calibratori e controlli e due diversi anticorpi policlonali che sono stati purificati mediante cromatografia di affinità. Tali anticorpi purificati sono specifici per due regioni diverse della molecola dell'osteocalcina. Il primo anticorpo, specifico dell'estremità amino dell'osteocalcina, è legato a una fase solida (granuli di polistirene). Il secondo anticorpo è specifico dell'estremità carbossi dell'osteocalcina umana ed è etichettato con¹²⁵I. I campioni sono incubati in un agitatore orbitale a temperatura ambiente per 2 ore. L'osteocalcina umana intatta 1-49 è l'unica forma di osteocalcina che si legherà sia all'anticorpo sul granulo che all'anticorpo etichettato con ¹²⁵I. Al termine del periodo di incubazione, ogni granulo viene lavato per rimuovere gli anticorpi liberi. La radioattività presente nel restante anticorpo legato viene quindi misurata mediante un contatore a raggi gamma. Le concentrazioni di osteocalcina 1-49 presenti nei campioni sono direttamente proporzionali alla radioattività misurata.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratori 0-5 N-Tact Osteo SP	6 fiale/1,0 mL
Granuli N-Tact Osteo SP	1 contenitore/100 granuli
Anticorpo ¹²⁵ I N-Tact Osteo SP	3 fiale/11 mL
Conc. per la soluzione di lavaggio N-Tact Osteo SP	1 fiala/ 50 mL
Controlli N-Tact Osteo SP	2 fiale/1,0 mL
Numero di test	100

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Conservare tutti i reagenti a -15° o a una temperatura inferiore, fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 Calibratori (0-5) N-tact® Osteo SP: reagente liofilizzato

Sei calibratori di osteocalcina umana 1-49, a concentrazioni nominali varianti fra 0-200 ng/mL (0,0 nmol/L - 33,9 nmol/L). I calibratori devono essere ricostruiti con 1,0 mL di acqua purificata prima dell'uso. I calibratori ricostituiti non devono essere sottoposti a più di due cicli di congelamento/scongelo. Il kit N-tact® Osteo SP DiaSorin è standardizzato mediante analisi quantitativa degli aminoacidi. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente se usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, secondo le raccomandazioni pertinenti.

4.2 Controlli N-tact® Osteo SP, Livello 1 e Livello 2: reagente liofilizzato

Nel siero tamponato chiarificato contenente Trasylol a 400 KIU/mL e 0,1% sodio azide si aggiunge osteocalcina umana 1-49. I controlli devono essere ricostruiti con 1,0 mL di acqua purificata prima dell'uso. I controlli ricostituiti non devono essere sottoposti a più di due cicli di congelamento/scongelo.

4.3 Granuli N-tact® Osteo SP: reagente pronto all'uso

Granuli in polistirene rivestiti con anticorpo di capra purificato mediante affinità specifico per l'estremità amino dell'osteocalcina umana.

4.4 Tracciante ¹²⁵I N-tact® Osteo SP: reagente pronto all'uso

Anticorpo di capra purificato mediante affinità specifico per l'estremità carbossi dell'osteocalcina umana, etichettato con iodio-125 e diluito in siero tamponato contenente 0,2% sodio azide e 0,2% gentamicin solfato.

4.5 Soluzione di lavaggio 10X: reagente concentrato

Concentrato di buffer fosfato 10X e Tween 20. Diluire dieci parti con acqua purificata prima dell'uso.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI ORIGINE UMANA

T trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza umana (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuali dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA,

Fraasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 4 μ Ci (148kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

- 6.1** Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.
- 6.2** Una diminuzione del legame massimo.
- 6.3** Un legame zero altamente non specifico.
- 6.4** Valori non soddisfacenti dei duplicati.

7. RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Sono richiesti venti microlitri di siero, in due serie, da usare per il kit N-tact® Osteo SP. È stato riscontrato che l'osteocalcina mostra una marcata variazione diurna con un livello massimo di notte e minimo alla fine della mattinata o all'inizio del pomeriggio.¹⁴ In considerazione di ciò, occorre tenere presente l'ora del prelievo dei campioni per l'interpretazione dei risultati. Raccogliere il sangue mediante puntura in vena in una provetta di vetro evacuata da 5 o 10 mL. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente. Centrifugare i campioni di sangue in una centrifuga refrigerata per ottenere siero senza emolisi. Separare subito il siero dalle cellule e congelarlo immediatamente. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere esente da qualsiasi contaminazione. I campioni possono essere conservati a -20°C fino a un massimo di 6 mesi. Se i campioni devono essere conservati per un periodo più lungo, devono essere mantenuti a -70°C o a una temperatura inferiore.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 8.1** Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.
- 8.2** Portaprovette.
- 8.3** Contatore calibrato a raggi gamma adatto per il conteggio di iodio-125.
- 8.4** Centrifugatore Vortex.
- 8.5** Dispositivi per operazioni con pipetta:
 - a.** Micropipetta calibrata per erogare 20 µL.
 - b.** Dosatori a ripetizione, calibrati per inviare 300 µL e 1 mL.
 - c.** Pipette volumetriche per la ricostituzione dei controlli e dei calibratori.
- 8.6** Pellicola o equivalente per coprire le provette.
- 8.7** Forcipe rivestito in teflon o altro accessorio approvato per questo kit per distribuire i granuli (ad eccezione delle provette per le conte totali).
- 8.8** Unità di aspirazione per aspirare l'anticorpo ¹²⁵I e le soluzioni di lavaggio.
- 8.9** Agitatore piastra orbitale in grado di operare a 190 ± 10 g/min con diametro orbitale approssimativo di 2 cm.
- 8.10** Acqua purificata.

9. PROCEDURA DI ANALISI

- 9.1** Ricostituire i reagenti liofilizzati e diluire 10X di soluzione di lavaggio (vedere la sezione sui reagenti). Mescolare completamente i calibratori ricostituiti e i controlli. Far stabilizzare tracciante e granuli a temperatura ambiente. Lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Tenere i calibratori, i controlli e i campioni congelati sul ghiaccio mentre si prepara l'analisi.
- 9.2** Preparare due serie di 12 provette da 75 mm in vetro etichettate in base allo schema di analisi in ultima pagina.

- 9.3** Aggiungere i reagenti nelle provette come indicato di seguito:
- a. Calibratore 0**
20 µL di calibratore 0
300 µL di tracciante (rosso)
 - b. Calibratori (A-E)**
20 µL di calibratore
300 µL di tracciante (rosso)
 - c. Controlli e campioni non noti**
20 µL di controllo o campione non noto
300 µL di tracciante (rosso)
 - d. Provette per il conteggio totale**
300 µL di tracciante (rosso)
- 9.4** Agitare nel vortex tutte le provette.
- 9.5** Distribuire un granulo (ad eccezione delle provette per le conte totali) in ogni provetta utilizzando un forcipe rivestito in teflon o un dosatore adatto (non utilizzare le dita).
- 9.6** Coprire le provette con pellicola o equivalente.
- 9.7** Agitare le provette con un agitatore orbitale a 190 ± 10 g/min per 2 ore \pm 5 minuti a 20 - 25°C.
- 9.8** Aspirare da ogni provetta la miscela formatasi dalla reazione (ECETTO dalle provette per il conteggio totale).
- 9.9** Lavare energicamente i granuli versando 1 mL di soluzione di lavaggio diluita in ogni provetta (ECETTO nelle provette per il conteggio totale) con una forza sufficiente a sollevare i granuli dal fondo della provetta. Aspirare la soluzione di lavaggio. Ripetere la procedura di lavaggio altre due volte.
- 9.10** Misurare la radioattività presente in ogni provetta utilizzando un contatore a raggi gamma.

10. COMMENTI ALLA PROCEDURA

- 10.1** Analizzare tutti i campioni in duplice serie per garantire l'affidabilità dei valori ottenuti.
- 10.2** Con la pipetta, aggiungere i campioni e il tracciante al terzo inferiore della provetta di analisi.
- 10.3** Quando si versano i granuli nelle provette, inclinare leggermente il portaprovette e far scivolare i granuli nelle provette. In questo modo si evita di far schizzare la soluzione di test. Non maneggiare i granuli con le dita.
- 10.4** Con un agitatore di diametro orbitale minore di 2 cm, regolare la velocità in modo da garantire che il contenuto venga agitato in maniera vigorosa.
- 10.5** Per monitorare completamente le prestazioni di un'analisi IRMA, è possibile controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare regolarmente i seguenti parametri:
- a. Conteggi totali**
 - b. % legame massimo**
$$\frac{(\text{CPM del calibratore E} - \text{CPM del calibratore 0})}{(\text{CPM dei conteggi totali} - \text{CPM del calibratore 0})} \times 100$$
 - c. Legame non specifico**
CPM delle provette del calibratore 0
- 10.6** Per convertire ng/mL in nmol/L; $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve includere almeno un controllo a livello basso e un controllo a livello alto in ogni analisi per monitorare le prestazioni. A tale fine possono essere utilizzati i controlli forniti con il kit. I controlli del kit contengono osteocalcina a concentrazioni alte e basse e sono stati analizzati utilizzando il kit N-tact® Osteo SP DiaSorin per stabilire i range previsti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili. I controlli devono essere considerati come campioni non noti e analizzati in duplice copia. Le analisi sono da ritenersi valide solo se i risultati corrispondono ai criteri del laboratorio per quanto concerne l'accettabilità.

12. CALCOLO DEI RISULTATI

Per stabilire la concentrazione di osteocalcina trovata in campioni di controllo e non noti, creare una curva utilizzando le concentrazioni del calibratore indicate sulle etichette delle fiale. I valori sono ottenuti come segue:

- 12.1** Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.
- 12.2** Sottrarre il CPM medio delle provette del calibratore 0 da tutti gli altri conteggi medi per ottenere i CPM esatti.
- 12.3** Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (per esempio, l'accumulo di 2.000 conteggi produrrà un errore del 5%; 10.000 conteggi produrranno un errore dell'1%).
- 12.4** Usando una carta millimetrata per modello log-log, tracciare l'esatto CPM del livello di ogni calibratore sull'asse delle ordinate e la concentrazione del calibratore sull'asse delle ascisse.
- 12.5** DiaSorin utilizza il metodo di riduzione dei dati della retta uniforme.
- 12.6** Interpolare i livelli di osteocalcina nei campioni dal tracciato.
- 12.7** Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito correttamente con il calibratore 0 e analizzato nuovamente.
- 12.8** Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.

13. DATI DI CAMPIONI PER L'ANALISI N-TACT® OSTEO SP

I dati di campioni tipici e una curva di calibratore per N-tact® Osteo SP sono riportati rispettivamente nella TABELLA I e nella FIGURA I. Queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

TABELLA I
Dati di campioni DiaSorin N-tact Osteo SP

Provetta	CPM duplicato	CPM medio	CPM corretto	Conc. (ng/mL)
Conteggio totale	307358 306568	306963		
Calibratore 0	282 240	261		
Calibratori (ng/mL) [nmol/L]				
A (1,5) [0,25]	915 1020	968	707	
B (5,0) [0,85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3,39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10,2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33,9]	78471 77768	78120	77859	
Campioni non noti				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25772 24402	25087	24826	44,00

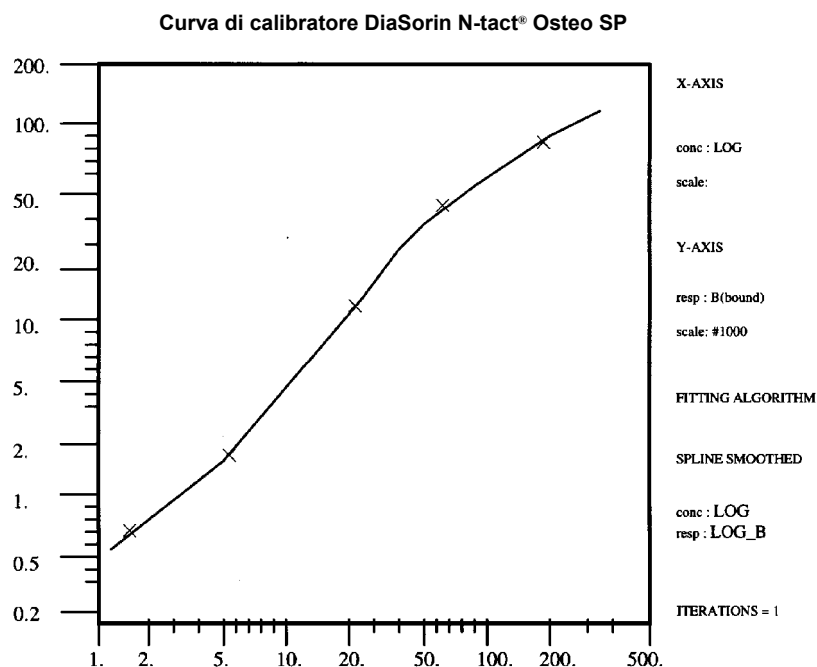


FIGURA 1

14. VALORI PREVISTI

Range di riferimento

È importante che ogni laboratorio stabilisca un range di riferimento proprio. Negli studi eseguiti da DiaSorin, i campioni di siero sono stati raccolti da 47 adulti apparentemente sani tra le ore 7 e le ore 10 del mattino. L'età media degli uomini era compresa tra 23 e 51 anni; quella delle donne in età premenopausa era compresa tra 26 e 50 anni. L'analisi di questi campioni ha dati seguenti risultati:

TABELLA II

	MEDIA GEOMETRICA (ng/mL)	RANGE DI RIFERIMENTO (ng/mL)
Maschi (n = 21)	6,25 [1,05 nmol/L]	3,2-12,2 [0,54-2,07 nmol/L]
Femmine (n = 26)	5,58 [0,94 nmol/L]	2,7-11,5 [0,46-1,95 nmol/L]

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Specificità analitica

L'analisi N-tact® Osteo SP DiaSorin misura solamente l'osteocalcina umana intatta 1-49. La reattività incrociata sul frammento 1-43 dell'osteocalcina umana è di < 0,01%.

15.2 Precisione

TABELLA III

Variazione intra-analisi (valori = ng/mL)

Precisione intra-analisi

Campione	Valore medio (n = 20)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

TABELLA IV

Variazione inter-analisi (valori = ng/mL)

Precisione inter-analisi

Campione	Valore medio (n = 10)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,20	9,0
2	5,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Affidabilità: è stata verificata l'affidabilità dell'analisi mediante il test di linearità e il test di recupero.

Linearità (Parallelismo)

TABELLA V

Studio di diluizione seriale di tre campioni (valori = ng/mL)

Campione	Non diluito	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Precisione

TABELLA VI

Studio di recupero di tre campioni di pazienti combinati con osteocalcina 1-49 (valori = ng/mL)

Numero campione	Aggiunto	Valore misurato	Percent. recupero
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità dell'analisi sono stati utilizzati tre traccianti (tutti otto giorni dopo la iodizzazione). È stato utilizzato il metodo di analisi backfit nel quale si calcola il CPM a 2 deviazioni standard dal calibratore zero e questo valore è letto come valore non noto dalla linea del calibratore.

Sulla base degli studi precedenti, si è determinato che la sensibilità del kit N-tact® Osteo SP è 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L).

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA

SCHEMA DI ANALISI

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni surgelati. Tenere i reagenti e i campioni congelati sul ghiaccio mentre si prepara l'analisi.
2. Contrassegnare due serie di provette.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	Cal. 0-5	Controllo e campioni non noti
Calibratori	-	20 µL	-
Controlli	-	-	20 µL
Campioni non noti	-	-	20 µL
Tracciante	300 µL	300 µL	300 µL

4. Mescolare bene.
5. Distribuire 1 granulo in ogni provetta (ad eccezione delle provette per le conte totali).
6. Coprire le provette con pellicola, agitarle a 190 +/- 10 g/min per 2 ore +/- 5 minuti a 20-25°C.
7. Aspirare la miscela di reazione da ciascuna provetta tranne da quelle per il conteggio totale.
8. Lavare energicamente i granuli versando 1 mL di soluzione di lavaggio diluita in ogni provetta con una forza sufficiente a sollevare i granuli dal fondo della provetta. Aspirare la soluzione di lavaggio. Ripetere due volte la procedura di lavaggio.
9. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma.

ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO DE OSTEOCALCINA N-TACT[®] OSTEO SP

1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

Este kit contém instruções e materiais indicados para a determinação quantitativa da osteocalcina intacta humana 1-49 no soro através de um ensaio imunoradiométrico (IRMA).

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A osteocalcina é uma proteína de 5900 Daltons, dependente da vitamina K, que tem sido descrita como uma das mais abundantes proteínas não colágenas do osso. A osteocalcina pode representar até 3% da proteína óssea total e contém dois ou três resíduos de aminoácidos de ácido gama carboxiglutâmico (GLA), de onde resulta a designação de proteína óssea GLA (BGP - Bone GLA Protein).¹ A BGP ou osteocalcina encontra-se apenas nos tecidos ósseos e é conhecida como sendo um produto do osteoblasto.²

Crê-se que desempenha um papel no processo de mineralização e está sob a influência de outras hormonas de regulação do cálcio: calcitonina,³ hormona paratiróide e vitamina D.^{4,5,6} Porque os níveis de osteocalcina constituem um reflexo directo da formação óssea, a sua determinação está estreitamente relacionada com o estado do metabolismo ósseo do doente.

Embora essas determinações, tais como a fosfatase alcalina e a hidroxiprolina, tenham sido amplamente utilizadas como marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, têm-se verificado limitações significativas à sua utilidade, pois elas tendem a ser não específicas. Geralmente, a osteocalcina correlaciona-se com a fosfatase alcalina, mas é possível que, ocasionalmente, grande parte da fosfatase alcalina presente no sangue não seja de origem óssea. Isto limita a sua utilidade enquanto marcador específico do "turnover" ósseo. A osteocalcina é, no entanto, completamente específica do osso. Verificam-se níveis elevados nas seguintes patologias: osteomalacia,⁷ doença de Paget do osso,⁸ hipertiroidismo,⁹ hiperparatiroidismo primário e osteodistrofia renal.¹⁰ Os níveis de osteocalcina podem estar elevados na osteoporose pós-menopausa, consoante haja um "turnover" ósseo alto ou baixo.³ Registam-se níveis reduzidos de osteocalcina no hipoparatiroidismo^{11,12} ou no seguimento de terapêutica de corticosteróides de longo prazo.^{9,13}

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio imunoradiométrico (IRMA) de osteocalcina da DiaSorin determina a osteocalcina intacta humana 1-49 sem reactividade cruzada com o fragmento 1-43. Este ensaio utiliza a osteocalcina humana 1-49 para calibradores e controlos e dois anticorpos policlonais, os quais foram purificados por cromatografia de afinidade. Estes anticorpos purificados são específicos de duas regiões diferentes da molécula de osteocalcina. O primeiro anticorpo, específico da região amino-terminal da osteocalcina humana, está ligado a uma fase sólida (esferas de poliestireno). O segundo anticorpo, específico da região carboxi-terminal da osteocalcina humana, está marcado com ¹²⁵I. As amostras são incubadas num agitador orbital à temperatura ambiente durante 2 horas. A osteocalcina intacta humana 1-49 é a única forma de osteocalcina que é ligada tanto pelo anticorpo da esfera, como pelo anticorpo marcado com ¹²⁵I. Após o período de incubação, cada esfera é lavada para remoção de qualquer anticorpo marcado não ligado. A radioactividade presente no anticorpo marcado ligado restante é, então, medida com um contador gama. A concentração de osteocalcina 1-49 presente na amostra é directamente proporcional à radioactividade medida.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Calibradores 0-5 N-Tact Osteo SP	6 frascos/1,0 mL
Esferas N-Tact Osteo SP	1 recipiente/100 esferas
Anticorpo ¹²⁵ I N-Tact Osteo SP	3 frascos/11 mL
Conc. de solução de lavagem N-Tact Osteo SP	1 frasco/50 mL
Controlos N-Tact Osteo SP	2 frascos/1,0 mL
Número de testes	100

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8°C. Conserve todos os reagentes reconstituídos a -15°C, ou a uma temperatura inferior, até à data de validade indicada no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após o prazo de validade.

Ao reconstituir o conteúdo dos frascos, agite com cuidado para evitar a formação de espuma. Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 Calibradores (0-5) N-tact® Osteo SP: reagente liofilizado

Seis calibradores de osteocalcina humana 1-49 em concentrações nominais compreendidas entre 0 e 200 ng/mL (0,0 nmol/L - 33,9 nmol/L). Os calibradores devem ser reconstituídos com 1,0 mL de água purificada antes da utilização. Os calibradores reconstituídos não devem ser submetidos a mais de duas descongelações. O Kit N-tact® Osteo SP da DiaSorin é padronizado pela análise quantitativa de aminoácidos. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras do paciente quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico *in vitro* tal como recomendado.

4.2 Controlos N-tact® Osteo SP, Nível 1 e Nível 2: reagente liofilizado

Soro humano tamponado clarificado contendo Trasylol a 400 KIU/mL e 0,1% de azida de sódio, artificialmente contaminado com osteocalcina humana 1-49. Os controlos devem ser reconstituídos com 1,0 mL de água purificada antes da utilização. Os controlos reconstituídos não devem ser submetidos a mais de duas descongelações.

4.3 Esferas N-tact® Osteo SP: reagente pronto a usar

Esferas de poliestireno revestidas com anticorpo de cabra purificado por afinidade, específico para a região amino-terminal da osteocalcina humana.

4.4 Traçador ¹²⁵I N-tact® Osteo SP: reagente pronto a usar

Anticorpo de cabra purificado por afinidade, específico para a região carboxi-terminal da osteocalcina humana, marcado com iodo 125 e diluído em soro de cabra tamponado contendo 0,2% de azida de sódio e 0,2% de sulfato de gentamicina.

4.5 Solução de lavagem 10X: reagente concentrado

Concentrado 10X de tampão fosfato e Tween 20. Dilua dez partições com água purificada antes da utilização.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM MATERIAL DE ORIGEM HUMANA

Trate como se fossem potencialmente infecciosos.

Cada unidade de doador de soro/plasma usada na preparação deste produto foi testada por um método aprovado pela FDA e determinada como sendo não reactiva no que diz respeito à presença de HBsAg, anticorpos anti-HCV e anticorpos anti-HIV 1/2. Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total no que concerne à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com as boas práticas laboratoriais, adoptando as precauções adequadas tal como descrito no

Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos" (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 4ª edição, Maio 1999 ou edição actual.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com o chumbo ou cobre das canalizações e formar azidas de metal altamente explosivo. Elimine-a com grandes quantidades de água para evitar a acumulação de azida. Para mais informações, consulte "Descontaminação de tubos de pias de laboratórios para remover sais de azidas," no Manual Guia-Gestão de Segurança N° CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)

R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.

S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com uma quantidade abundante de água.

REAGENTES COM IODO 125

Este kit contém material radioactivo que não excede 30 µCi (1110 kBq) de iodo 125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e adoptadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebem radioisótopos ao abrigo de uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou da radiação resultante, em seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos ou do estado com o qual a Comissão tenha celebrado um acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve limitar-se a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve limitar-se apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo com a boca.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer derrames devem ser limpas e lavadas com um detergente alcalino ou uma solução de descontaminação radiológica. Qualquer material de vidro usado deve ser completamente enxaguado com água antes da lavagem com qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem radioisótopos ao abrigo de uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições da sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso no folheto informativo da embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indica a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto o folheto informativo da embalagem indica a radioactividade teórica do kit.

6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT

- 6.1** Um desvio na inclinação ou posição da curva de calibragem em relação à que é normalmente obtida.
- 6.2** Uma diminuição na ligação máxima.
- 6.3** Uma ligação zero não específica alta.
- 6.4** Valores duplicados pequenos.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

São necessários vinte microlitros de soro, em duplicado, para utilização no Kit N-tact® Osteo SP.

Está demonstrado que a osteocalcina apresenta uma variação diurna significativa com um nível máximo à noite e um nível mínimo ao fim da manhã ou ao princípio da tarde.¹⁴ O tempo de amostragem deve ser, por isso, levado em consideração aquando da interpretação dos resultados. Recolha uma amostra de sangue por venipunctura num tubo de vidro vazio de 5 ou 10 mL. Deixe o sangue coagular à temperatura ambiente. Centrifugue as amostras de sangue durante quinze minutos numa centrífuga refrigerada para obter soro sem hemólise. Separe rapidamente o soro das células e congele imediatamente. Qualquer plástico, vidro ou outro material que entrar em contacto com a amostra deve estar completamente descontaminado.

As amostras podem ser armazenadas a -20°C durante um período máximo de seis meses. Se for necessário um período de conservação mais prolongado, conserve as amostras a -70°C ou a uma temperatura inferior.

8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- 8.1** Tubos de vidro descartáveis de borossilicato, 12 x 75 mm.
- 8.2** Suporte para tubos de ensaio.
- 8.3** Contador gama calibrado capaz de contar iodo 125.
- 8.4** Misturador tipo Vortex.
- 8.5** Dispositivos de pipetagem:
 - a.** Micropipetador calibrado para administração de 20 µL.
 - b.** Distribuidores de repetição, calibrados para administração de 300 µL e 1 mL.
 - c.** Pipetas volumétricas para reconstituição de controlos e calibradores.
- 8.6** Parafilme ou material equivalente para cobertura dos tubos de ensaio.
- 8.7** Fórceps revestidos de Teflon ou outro dispositivo aprovado para a distribuição de esferas.
- 8.8** Unidade de aspiração para aspirar anticorpos ¹²⁵I e soluções de lavagem.
- 8.9** Agitador orbital capaz de 190 ± 10 rpm com um diâmetro orbital aproximado de 2 cm.
- 8.10** Água purificada.

9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- 9.1** Reconstitua os reagentes liofilizados e dilua a solução de lavagem 10X (Consulte a Secção Reagentes). Agite bem os calibradores e os controlos reconstituídos. Aguarde que o traçador e as esferas estabilizem à temperatura ambiente. Aguarde que as amostras congeladas descongelem completamente. Mantenha os calibradores, os controlos e as amostras descongeladas no gelo enquanto prepara o ensaio.
- 9.2** Marque, em duplicado, tubos de vidro de borossilicato de 12 x 75 mm, de acordo com o esquema do ensaio da última página.

- 9.3** Adicione os reagentes aos tubos da seguinte forma:
- a. Calibrador 0**
20 µL de Calibrador 0
300 µL de Traçador (vermelho)
 - b. Calibradores (A-E)**
20 µL de Calibrador
300 µL de Traçador (vermelho)
 - c. Controlos e amostras desconhecidas**
20 µL de controlo ou amostra desconhecida
300 µL de Traçador (vermelho)
 - d. Tubos de contagens totais**
300 µL de Traçador (vermelho)
- 9.4** Agite todos os tubos num agitador tipo Vortex.
- 9.5** Deite uma esfera em cada tubo (À EXCEPÇÃO dos tubos de contagem totais) com fórceps revestidos de Teflon ou com um dispensador adequado para o manuseamento de esferas. (Não utilize os dedos.)
- 9.6** Tape os tubos com parafilme ou um material equivalente.
- 9.7** Agite os tubos num agitador orbital a 190 ± 10 rpm durante 2 horas \pm 5 minutos a 20 - 25°C.
- 9.8** Aspire a mistura de reacção de cada tubo (À EXCEPÇÃO dos tubos de contagens totais).
- 9.9** Lave as esferas, deitando vigorosamente 1 mL de solução de lavagem diluída em cada tubo (À EXCEPÇÃO dos tubos de contagens totais), com força suficiente para levantar a esfera do fundo do tubo de ensaio. Aspire a solução de lavagem. Repita o procedimento de lavagem mais duas vezes.
- 9.10** Meça a radioactividade presente em cada tubo com um contador gama.
- 10. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO**
- 10.1** Efectue o ensaio de todas as amostras em duplicado para garantir um elevado grau de confiança nos valores obtidos.
- 10.2** Pipete as amostras e o traçador no terço inferior do tubo de ensaio.
- 10.3** Ao adicionar as esferas aos tubos, incline ligeiramente o suporte dos tubos de ensaio e deixe que as esferas rolem para dentro dos mesmos. Evitará, assim, salpicos excessivos de solução de teste. Não manuseie as esferas com os dedos.
- 10.4** No caso de agitadores com um diâmetro orbital inferior a 2 cm, ajuste a velocidade de modo a obter uma agitação vigorosa.
- 10.5** Para monitorizar completamente o desempenho consistente de um ensaio IRMA, devem verificar-se factores adicionais. A DiaSorin sugere a verificação dos parâmetros seguintes.
- a. Contagens totais**
 - b. % Ligação máxima**
$$\frac{(\text{CPM do calibrador E} - \text{CPM do calibrador 0})}{(\text{CPM das contagens totais} - \text{CPM do calibrador 0})} \times 100$$
 - c. Ligação não específica**
CPM dos tubos do calibrador 0
- 10.6** Para converter ng/mL em nmol/L; $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir pelo menos um controlo alto e um controlo baixo em cada ensaio para monitorizar o desempenho do ensaio. Podem utilizar-se, para este fim, os controlos fornecidos juntamente com o kit. Os controlos do kit contêm osteocalcina em concentrações altas e baixas e foram determinados utilizando o Kit N-tact® Osteo SP da DiaSorin para estabelecer os intervalos de referência. O intervalo de concentrações de cada controlo é referido no certificado de análise e indica os limites estabelecidos pela DiaSorin para os valores de controlo que podem ser obtidos em ensaios fidedignos. Os controlos devem ser tratados como se fossem amostras desconhecidas e determinados em duplicado. Os ensaios só devem ser considerados válidos se os resultados estiverem em conformidade com os critérios de aceitabilidade do laboratório.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Para determinar a concentração de Osteocalcina presente nos controlos e nas amostras desconhecidas, prepara-se uma curva de calibragem utilizando as concentrações do calibrador indicadas nos rótulos dos frascos. Os valores são gerados da seguinte forma:

- 12.1** Calcule a média das CPM para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.
- 12.2** Subtraia a média das CPM dos tubos do calibrador 0 a todas as outras contagens médias para obter as CPM corrigidas.
- 12.3** Os tempos de contagem devem ser suficientes para reduzir os erros estatísticos (por exemplo, a acumulação de 2.000 contagens produzirá um erro de 5%; 10.000 contagens produzirão um erro de 1%).
- 12.4** Usando papel milimétrico logarítmico, desenhe as CPM corrigidas de cada nível do calibrador na ordenada e a concentração do calibrador na abcissa.
- 12.5** A DiaSorin utiliza o método de curvas "spline" como método de cálculo de dados.
- 12.6** Interpole os níveis de Osteocalcina nas amostras a partir do gráfico.
- 12.7** Se uma amostra desconhecida apresentar uma leitura superior à do calibrador mais alto, deve ser devidamente diluída com o calibrador 0 e novamente testada.
- 12.8** Se uma amostra desconhecida tiver sido diluída, corrija-a de acordo com o factor de diluição adequado.

13. DADOS DA AMOSTRA PARA O ENSAIO N-TACT[®] OSTEO SP

Os dados típicos da amostra e a curva de calibragem para o N-tact[®] Osteo SP são apresentados na TABELA I e na FIGURA I, respectivamente. Esta informação serve apenas como referência e não deverá ser utilizada para o cálculo de qualquer valor.

TABELA I
Dados da amostra N-tact Osteo SP DiaSorin

Tubo	CPM Duplicado	CPM Médias	CPM Corrigidas	Conc. (ng/mL)
Contagens totais	307358 306568	306963		
Calibrador 0	282 240	261		
Calibradores (ng/mL) [nmol/L]				
A (1,5) [0,25]	915 1020	968	707	
B (5,0) [0,85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3,39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10,2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33,9]	78471 77768	78120	77859	
Amostras desconhecidas				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25772 24402	25087	24826	44,00

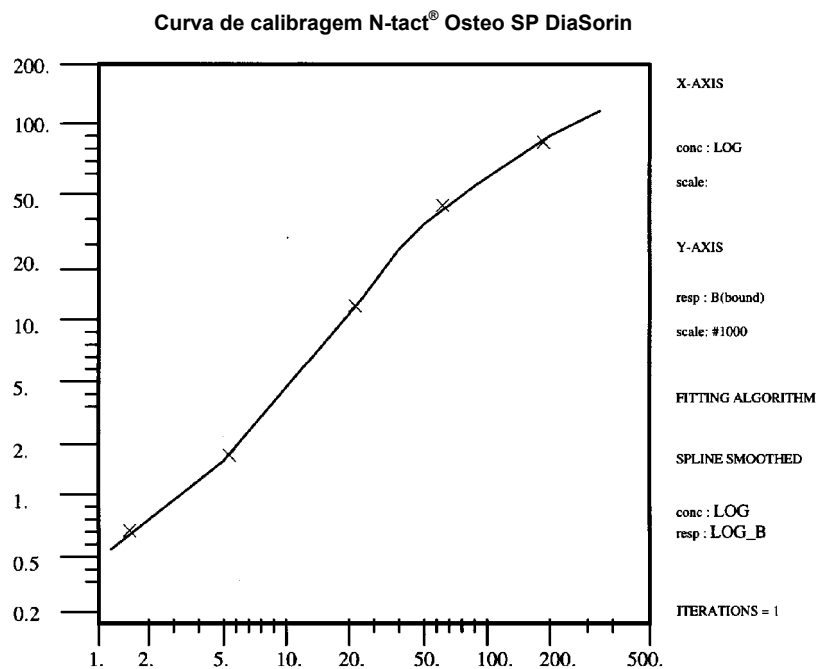


FIGURA 1

14. VALORES DE REFERÊNCIA

Intervalo de referência

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de referência. Em estudos realizados pela DiaSorin, recolheram-se amostras de soro de quarenta e sete adultos aparentemente saudáveis entre as 7 e as 10 horas da manhã. Os homens tinham idades compreendidas entre os 23 e os 51 anos; as mulheres em estado de pré-menopausa tinham idades compreendidas entre os 26 e os 50 anos. A análise destas amostras deu os seguintes resultados:

TABELA II

	MÉDIA GEOMÉTRICA (ng/mL)	INTERVALO DE REFERÊNCIA (ng/mL)
Homens (n = 21)	6,25 [1,05 nmol/L]	3,2-12,2 [0,54-2,07 nmol/L]
Mulheres (n = 26)	5,58 [0,94 nmol/L]	2,7-11,5 [0,46-1,95 nmol/L]

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

15.1 Especificidade analítica

O ensaio N-tact® Osteo SP da DiaSorin só determina a osteocalcina intacta humana 1-49. A reactividade cruzada com a osteocalcina humana 1-43 é < 0,01%.

15.2 Precisão

TABELA III
Variação intra-ensaio (valores = ng/mL)

Precisão intra-ensaio			
Amostra	Valor médio (n = 20)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

TABELA IV
Variação inter-ensaio (valores = ng/mL)

Precisão inter-ensaio			
Amostra	Valor médio (n = 10)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,20	9,0
2	5,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Veracidade: A veracidade do ensaio foi verificada através do teste de linearidade e do teste de recuperação.

Linearidade (Paralelismo)

TABELA V
Estudo de diluição em série de três amostras de pacientes (valores = ng/mL)

Amostra	Não diluída	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Exactidão

TABELA VI
Estudo de recuperação de três amostras de pacientes artificialmente contaminadas com Osteocalcina 1-49 (valores = ng/mL)

Número Amostra	Adicionada	Valor Medido	Porcentagem Recuperação
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Sensibilidade analítica

Foram utilizados três traçadores (todos oito dias após a iodinação) para determinação da sensibilidade do ensaio. Utilizou-se um método de análise de conformidade segundo o qual se calculam as CPM a 2 desvios padrão do calibrador zero, sendo este valor lido como desconhecido na linha de calibragem.

Com base nos estudos supracitados, a sensibilidade do kit N-tact® Osteo SP foi determinada como sendo de 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L).

CONSULTE A ÚLTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

ESQUEMA DO ENSAIO

1. Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe descongelar totalmente qualquer amostra congelada. Mantenha os reagentes e as amostras descongeladas no gelo enquanto prepara o ensaio.
2. Identifique os tubos em duplicado.
3. Distribua os reagentes de acordo com o seguinte esquema:

Tubos/Reagentes	Contagens totais	Cal 0-5	Controlos e amostras desconhecidas
Calibradores	-	20 µL	-
Controlos	-	-	20 µL
Amostras desconhecidas	-	-	20 µL
Traçador	300 µL	300 µL	300 µL

4. Agite bem.
5. Deite 1 esfera em todos os tubos (À EXCEPÇÃO dos tubos de contagem totais).
6. Tape os tubos com parafilme, agite os tubos a 190 +/- 10 rpm durante 2 horas +/- 5 minutos a 20-25°C.
7. Aspire a mistura de reacção de cada tubo, à excepção dos tubos de contagens totais.
8. Lave as esferas, deitando vigorosamente 1 mL de solução de lavagem diluída em cada tubo, com força suficiente para levantar a esfera do fundo do tubo de ensaio. Aspire a solução de lavagem. Repita o procedimento de lavagem 2 vezes.
9. Conte cada tubo num contador gama.

N-TACT® OSTEO SP OSTEOKALCIN IMMUNRADIOMETRISK ASSAY

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK *IN VITRO*

Satsen innehåller anvisningar och materiel för kvantitativ bestämning av intakt humant osteokalcin 1-49 i serum med immunradiometrisk assay (IRMA).

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Osteokalcin är ett K-vitaminberoende protein med en molekylvikt på 5900 dalton och har beskrivits som ett av de vanligaste icke-kollagena proteinerna i benvävnad. Det kan utgöra upp till 3 % av totalt benprotein och innehåller två eller tre gamma-karboxyglutaminsyrarester (GLA); därav benämningen "bone GLA protein" (BGP).¹ BGP, eller osteokalcin, finns endast i benvävnad och bildas av osteoblasterna.²

Man tror att det spelar en roll i mineraliseringsprocessen, och det kontrolleras av de övriga kalciumreglerande hormonerna: kalcitonin,³ parathormon och D-vitamin.^{4,5,6} Eftersom osteokalcinnivåerna direkt speglar benomsättningen, föreligger det en nära korrelation mellan osteokalcinnivån och patientens benmetabolism.

Även om tester som alkaliskt fosfatas och hydroxyprolin ofta har använts som biokemiska markörer för benmetabolism, har deras användbarhet varit avsevärt begränsad, eftersom de är förhållandevis ospecifika. I allmänhet föreligger det en korrelation mellan osteokalcin och alkaliskt fosfatas; men ibland härrör en stor del av det alkaliska fosfataset i blodet från andra vävnader än ben, vilket innebär en begränsning i dess användbarhet som en markör för benomsättning. Osteokalcin däremot är helt specifikt för benväv, och har visat sig vara förhöjt vid följande tillstånd: Osteomalaci,⁷ Pagets sjukdom,⁸ hypertyreoidism,⁹ primär hyperparatyreoidism och renal osteodystrofi.¹⁰ Osteokalcin är i varierande grad förhöjt vid postmenopausal osteoporos, beroende på om det föreligger hög eller låg benomsättning.³ Sänkta nivåer av osteokalcin ses vid hypoparatyreoidism,^{11,12} eller långvarig behandling med kortikosteroider.^{9,13}

3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin immunradiometrisk assay (IRMA) för osteokalcin mäter intakt humant osteokalcin 1-49 utan någon korsreaktivitet med 1-43-fragmentet. Assayen använder humant osteokalcin 1-49 i kalibreringslösningar och kontroller samt två polyklonala antikroppar som renats med hjälp av affinitetskromatografi. De renade antikropparna har specificitet för två olika regioner i osteokalcinmolekylen. Den första antikroppen, som är specifik för N-terminalen i humant osteokalcin, är bunden till en fast fas (polystyrenpärlor). Den andra antikroppen är specifik för C-terminalen i humant osteokalcin och är inmärkt med ¹²⁵I. Proverna inkuberas på en rotationsskak i 2 timmar. Intakt humant osteokalcin 1-49 är den enda form av osteokalcin som binder till både antikroppen på pärlorna och den ¹²⁵I-märkta antikroppen. Efter inkuberingen tvättas varje pärla så att obundna inmärkta antikroppar sköljs bort. Därefter mäts radioaktiviteten i de kvarvarande bundna inmärkta antikropparna med en gammarräknare. Halten osteokalcin 1-49 i provet är direkt proportionell mot den uppmätta radioaktiviteten.

3. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

N-Tact Osteo SP kalibreringslösningar 0-5	6 flaskor à 1,0 mL
N-Tact Osteo SP pärlor	1 burk/100 pärlor
¹²⁵ I N-Tact Osteo SP antikropp	3 flaskor à 11 mL
N-Tact Osteo SP koncentrerad tvättlösning	1 flaska/50 mL
N-Tact Osteo SP kontroller	2 flaskor à 1,0 mL
Antal test	100

FÖRVARING: Öppnad förpackning förvaras vid 2-8 °C. Efter rekonstituering förvaras alla reagens vid högst -15 °C till det utgångsdatum som anges på etiketten. Reagensen får ej användas efter utgångsdatum.

När man rekonstituerar innehållet i flaskorna måste man blanda försiktigt för att undvika skumbildning. Reagens från skilda batcher får ej blandas.

4.1 N-tact® Osteo SP kalibreringslösningar (0-5): frystorkade reagens

Sex kalibreringslösningar med humant osteokalcin 1-49, i nominella halter på 0 - 200 ng/mL (0,0 nmol/L - 33,9 nmol/L). Kalibreringslösningarna måste rekonstitueras med 1,0 mL renat vatten innan de används. Rekonstituerade kalibreringslösningar får ej genomgå mer än två frysnings-upptinningscykler. DiaSorin N-tact® Osteo SP Kit standardiseras genom kvantitativ aminosyraanalys. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover, när de används med de reagens och metoanvisningar om rekommenderas för detta diagnostiska *in vitro*-test.

4.2 N-tact® Osteo SP kontroller, nivå 1 och nivå 2: frystorkade reagens

Buffrat, klarat, humant serum med 400 KIU/mL Trasylol och 0,1 % natriumazid, med tillsats av humant osteokalcin 1-49. Kontrollerna måste rekonstitueras med 1,0 mL renat vatten innan de används. Rekonstituerade kontroller får ej genomgå mer än två frysnings-upptinningscykler.

4.3 N-tact® Osteo SP pärlor: reagens färdigt för användning

Polystyrenpärlor belagda med affinitetsrenad getantikropp specifik för N-terminalen i humant osteokalcin.

4.4 ¹²⁵I N-tact® Osteo SP spårämne: reagens färdigt för användning

Affinitetsrenad getantikropp, specifik för C-terminalen i humant osteokalcin, inmärkt med jod-125 och upplöst i buffrat getserum med 0,2 % natriumazid och 0,2 % gentamicinsulfat.

4.5 10X tvättlösning: koncentrerat reagens

10X-koncentrat av fosfatbuffert och Tween 20. Spädes tio gånger med renat vatten före användning.

5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

Behandlas som potentiellt smittfarligt.

Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk (FDA) och befunnits negativ vad gäller förekomst av HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder enligt handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga.

REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

FÖRSIKTIGT! Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1976.

Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 30 µCi (1110 kBq) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:

Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärfas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laboratorietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens:

När ni tar emot, använder, överläter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

WARNING! Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

OBSERVERA! Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETFÖRSÄMRING HOS REAGENSEN I SATSEN

- 6.1 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som normalt erhålles.
- 6.2 En sänkning av maximal bindning.
- 6.3 En hög ospecifik bindning.
- 6.4 Dålig överensstämmelse mellan dubbelprover.

7. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Det behövs dubbelprover à 20 mikroliter serum för N-tact® Osteo SP Kit.

Det har visat sig att osteokalcin uppvisar en markerad dygnsvariation med en maximal halt nattetid och ett minimum under sen förmiddag eller tidig eftermiddag.¹⁴ Man måste därför ta hänsyn till provtagningstiden vid tolkning av resultaten. Tag venprov i ett 5 eller 10 ml glasrör av vacutainertyp. Låt blodet koagulera vid rumstemperatur. Centrifugera proverna i 15 minuter i en kyld centrifug, så att hemolysfritt serum erhålles. Separera omedelbart serum från celler och frys det genast. Alla plastartiklar, glasvaror och annan materiel som kommer i kontakt med provet måste vara fullkomligt fria från kontaminerande material.

Proverna kan lagras upp till sex månader vid -20 °C. Om de behöver sparas längre, skall de förvaras vid -70 °C eller kallare.

8. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

- 8.1 Engångs borosilikatglasrör, 12 x 75 mm.
- 8.2 Provrörsställ.
- 8.3 Kalibrerad gammadräknare som kan räkna jod-125.
- 8.4 Vortex-blandare.
- 8.5 Pipetteringshjälpmedel
 - a. Mikropipett kalibrerad för 20 µL.
 - b. Repeterande dispensorer, kalibrerade för 300 µL och 1 mL.
 - c. Vollpipetter för rekonstituering av kontroller och kalibreringslösningar.
- 8.6 Parafilm eller motsvarande för att täcka över provrören.
- 8.7 Teflonöverdragen pincett eller annat redskap för portionering av pärlor, som är godkänt för denna sats.
- 8.8 Sugapparat för att suga bort ¹²⁵I-antikroppen och tvättlösningen.
- 8.9 Rotationsskak som kan rotera 190 ± 10 rpm med en ungefärligt rotationsdiameter på 2 cm.
- 8.10 Renat vatten.

9. TESTPROCEDUR

- 9.1 Rekonstituera de frystorkade reagensen och spädd den koncentrerade tvättlösningen (se avsnittet Reagens). Blanda de rekonstituerade kalibreringslösningarna och kontrollerna noga. Låt spårämne och pärlor anta rumstemperatur. Låt eventuellt frysta prover tina fullständigt. Låt kalibreringslösningar, kontroller och tinade prover stå på is medan assayen förbereds.
- 9.2 Ställ i ordning märkta 12 x 75 mm borosilikatglasrör för dubbelprov enligt Lathund för testet på baksidan av omslaget.
- 9.3 Tillsätt reagens till rören enligt följande:
 - a. **0-kalibreringslösning**
20 µL 0-kalibreringslösning
300 µL spårämne (rött)
 - b. **Kalibreringslösningar (A-E)**
20 µL kalibreringslösning
300 µL spårämne (rött)
 - c. **Kontroller och okända prover**
20 µL kontroll eller okänt prov
300 µL spårämne (rött)
 - d. **Totalaktivetsrör**
300 µL spårämne (rött)
- 9.4 Vortexa alla rör.
- 9.5 Tillsätt en pärla till varje rör (UTOM totalaktivetsrören) med hjälp av en teflonöverdragen pincett eller annat lämpligt redskap för hantering av pärlor. (Använd inte fingrarna.)
- 9.6 Täck rören med parafilm eller liknande.
- 9.7 Sätt rören på skakning på en rotationsskak vid 190 ± 10 rpm och 20 - 25 °C i 2 timmar ± 5 minuter.
- 9.8 Sug bort reaktionsblandningen från alla rör (UTOM totalaktivetsrören).
- 9.9 Tvätta pärlorna genom att spruta ned 1 mL utspädd tvättlösning i varje rör (UTOM totalaktivetsrören) med så kraftig stråle att pärlan lyfts upp från provrörets botten. Sug bort tvättlösningen. Upprepa tvättproceduren ytterligare 2 gånger.
- 9.10 Mät radioaktiviteten i varje rör med en gammadräknare.

10. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

- 10.1 Testa dubbelprov av alla prover för att garantera tillförlitliga resultat.
- 10.2 Pipettera prov och spårämne till den nedersta tredjedelen av provröret.
- 10.3 När man tillsätter pärlor till provrören skall man luta provrörsstället en smula och låta pärlorna rulla ned i rören. På så sätt undviker man att provlösningen stänker för mycket. Tag ej i pärlorna med fingrarna.
- 10.4 Skulle den skak som används ha en rotationsdiameter som är mindre än 2 cm, justerar man hastigheten i motsvarande grad för att få kraftig skakning.
- 10.5 För att bekräfta att ett IRMA-test ger konsekventa resultat kan man kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man regelbundet kontrollerar följande parametrar.

- a. **Totalaktivitet**
- b. **% maximal bindning**

$$\frac{(\text{CPM för kalibreringslösning E} - \text{CPM för kalibreringslösning 0})}{(\text{CPM totalaktivitet} - \text{CPM för kalibreringslösning 0})} \times 100$$

- c. **Ospecifik bindning**
CPM för rören med kalibreringslösning 0

- 10.6 För att omvandla ng/mL till nmol/L: $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. KVALITETSKONTROLL

Varje laboratorium bör ta med minst en hög och en låg kontroll i varje assaykörning för att kontinuerligt övervaka prestanda för assayen. Kontrollerna i satsen kan användas för detta ändamål. Kontrollerna i satsen innehåller osteokalcin i både höga och låga koncentrationer och har testats med DiaSorin N-tact® Osteo SP Kit för att fastställa de förväntade halterna. Koncentrationsområdet för varje kontroll rapporteras på analyscertifikatet och anger gränserna som fastställts av DiaSorin för kontrollvärden som kan erhållas i tillförlitliga analysserier. Kontrollerna skall behandlas som okända prover och testas i dubbelprov. För att testresultaten skall betraktas som giltiga måste kontrollresultaten uppfylla laboratoriets kriterier för godkännande.

12. RESULTATBERÄKNING

För att få fram osteokalcinhalten i kontroller och okända prover gör man i ordning en kalibreringskurva med utgångspunkt i de halter för kalibreringslösningarna som anges på etiketterna. Värdena erhålls på följande sätt:

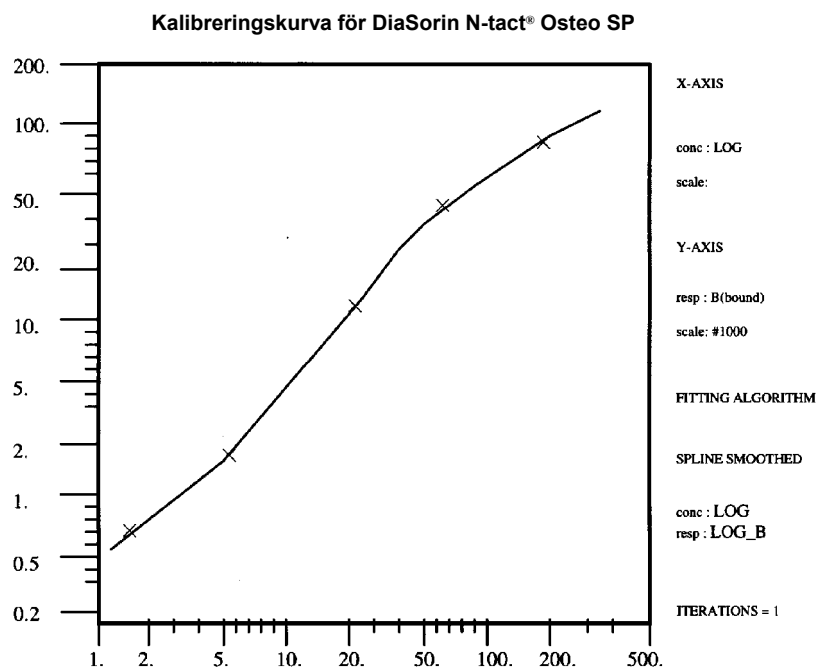
- 12.1 Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.
- 12.2 Subtrahera medel-CPM för rören med kalibreringslösning 0 från alla övriga medelvärden för att på så sätt få fram korrigerade CPM-värden.
- 12.3 Aktiviteten i rören måste räknas under tillräckligt lång tid för att man skall kunna undvika statistiska fel (till exempel ger en räkning av 2 000 CPM ett fel på 5 %; 10 000 CPM ger ett fel på 1 %).
- 12.4 Använd ett log-log-papper och plotta det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning (på y-axeln) avsatt mot halten i kalibreringslösningen (på x-axeln).
- 12.5 DiaSorin använder en metod med mjuk splinefunktion för datareduktion.
- 12.6 Läs av osteokalcinhalten i proverna från kurvan.
- 12.7 Om ett okänt prov ger ett högre värde än den högsta kalibreringslösningen, skall provet spädas på lämpligt sätt med kalibreringslösning 0 och därefter testas på nytt.
- 12.8 Om ett okänt prov har späts, korrigerar man för spädningsfaktorn.

13. EXEMPELDATA FÖR N-TACT® OSTEO SP ASSAY

Typiska provdata och en kalibreringskurva för N-tact® Osteo SP visas i TABELL I respektive FIGUR I. Denna information är endast avsedd som ett exempel och skall inte användas för att beräkna några värden.

TABELL I
Exempeldata för DiaSorin N-tact Osteo SP

Rör	CPM för dubbelprov	Medel-CPM	Korrigerad CPM	Konc. (ng/mL)
Totalaktivitet	307358 306568	306963		
0-kalibreringslösning	282 240	261		
Kalibreringslösningar (ng/mL) [nmol/L]				
A (1,5) [0,25]	915 1020	968	707	
B (5,0) [0,85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3,39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10,2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33,9]	78471 77768	78120	77859	
Okända prover				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25772 24402	25087	24826	44,00



FIGUR 1

14. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Referensområde

Varje laboratorium bör upprätta ett eget referensområde. I studier som DiaSorin utfört togs serumprover från 47 till synes friska vuxna mellan kl 7:00 och 10:00. Männen var 23 - 51 år gamla; de premenopausala kvinnorna 26 - 50. Analys av dessa prover gav följande resultat:

	TABELL II			
	GEOMETRISKT MEDELVÄRDE	REFERENSOMRÅDE		
	(ng/mL)	(ng/mL)		
Män (n = 21)	6,25	3,2-12,2		
	[1,05 nmol/L]	[0,54-2,07 nmol/L]		
Kvinnor (n = 26)	5,58	2,7-11,5		
	[0,94 nmol/L]	[0,46-1,95 nmol/L]		

15. SPECIFIKA PRESTANDA

15.1 Analytisk specificitet

Assayen med DiaSorin N-tact® Osteo SP mäter endast intakt humant osteokalcin 1-49. Korsreaktiviteten gentemot humant osteokalcin 1-43 är < 0,01%.

15.2 Precision

TABELL III

Intraseriell variation (värden i ng/mL)

Intraseriell precision

Prov	Medelvärde (n = 20)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

TABELL IV

Interseriell variation (värden i ng/mL)

Interseriell precision

Prov	Medelvärde (n = 10)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,20	9,0
2	,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Riktighet: Riktigheten för assayen kontrollerades med ett linearitetstest och ett utbytestest.

Linearitet (parallellitet)

TABELL V

Seriespänningsstudie på tre patientprover (värden i ng/mL)

Prov	Outspätt	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Noggrannhet

TABELL VI

Utbytestudie på tre patientprover med tillsats av osteokalcin 1-49 värden i ng/mL)

Prov nummer	Tillsats	Uppmätt värde	Procent utbyte
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Analytisk känslighet

Tre spårämnen användes (samtliga åtta dagar efter jodinerings) för att fastställa assayens känslighet. För analysen användes "backfit"-metoden, där man beräknar CPM-värdet vid två standardavvikelser från nollkalibreringslösningen och läser av detta värde som ett okänt prov i kalibreringskurvan.

Baserat på dessa studier har känsligheten hos N-tact® Osteo SP Kit fastställts till 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L).

SE SISTA SIDAN FÖR REFERENSER

LATHUND FÖR TESTET

1. Rekonstituera de frystorkade reagensen och låt eventuella frysta prover tina helt. Låt reagens och tinade prover stå på is medan assayen förbereds.
2. Märk upp rör för dubbelprover.
3. Pipettera reagens enligt följande schema:

Rör/Reagens	Totalaktivitet	CAL 0-5	Kontroller och okända prover
Kalibreringslösningar	-	20 µL	-
Kontroller	-	-	20 µL
Okända prover	-	-	20 µL
Spårämne	300 µL	300 µL	300 µL

4. Blanda väl.
5. Tillsätt en pärla till varje rör (UTOM totalaktivitetsrören).
6. Täck rören med parafilm, skaka rören i 2 timmar +/- 5 minuter vid 190 +/- 10 rpm och 20-25 °C.
7. Sug bort reaktionsblandningen från alla rör utom totalaktivitetsrören.
8. Tvätta pärlorna genom att spruta ned 1 mL utspädd tvättlösning i varje rör med så kraftig stråle att pärlan lyfts upp från provrörets botten. Sug bort tvättlösningen. Upprepa tvättproceduren 2 gånger.
9. Räkna varje rör i gammarräknare.

N-TACT® ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΣΤΕΟΚΑΛΣΙΝΗΣ/ΟΣΤΕΟ SP

1. ΠΡΟΤΙΘΕΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΓΙΑ *IN VITRO* ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Το κιτ περιέχει οδηγίες και υλικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της άθικτης ανθρώπινης οστεοκαλσίνης 1-49 στον ανθρώπινο ορό μέσω ανοσοραδιομετρικής μεθόδου (IRMA).

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η οστεοκαλσίνη είναι μια πρωτεΐνη 5900 dalton που εξαρτάται από τη βιταμίνη Κ και που έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις πλέον άφθονες μη κολλαγόνες πρωτεΐνες στα οστά. Η οστεοκαλσίνη ενδέχεται να ευθύνεται σε ποσοστό που φτάνει ως και το 3% για τις συνολικές πρωτεΐνες των οστών και περιέχει κατάλοιπα δύο ή τριών αμινοξέων γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος (GLA), γι' αυτό και η προοριζόμενη πρωτεΐνη GLA των οστών (BGP).¹ BGP ή οστεοκαλσίνη εντοπίζεται μόνο στον ιστό των οστών και είναι γνωστό ότι αποτελεί προϊόν του οστεοβλάστη.²

Θεωρείται ότι παίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία μεταλλογένεσης και επηρεάζεται από τις άλλες ορμόνες που ρυθμίζουν το ασβέστιο : καλσιτονίνη,³ ορμόνη του παραθυροειδούς και βιταμίνη D.^{4,5,6} Επειδή τα επίπεδα της οστεοκαλσίνης αντικατοπτρίζουν άμεσα την δημιουργία των οστών, ο υπολογισμός της συνδέεται στενά με την κατάσταση του μεταβολισμού των οστών του ασθενούς.

Ενώ τέτοιου είδους υπολογισμοί, όπως της αλκαλικής φωσφατάσης και της υδροξυπρολίνης, χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιοχημικοί δείκτες του μεταβολισμού των οστών, η χρήση τους έχει περιοριστεί σημαντικά επειδή τείνουν να μην είναι ιδιαίτερα ακριβείς. Γενικά, η οστεοκαλσίνη συσχετίζεται με την αλκαλική φωσφατάση, αλλά ορισμένες φορές, μεγάλο ποσοστό της αλκαλικής φωσφατάσης στο αίμα μπορεί να μην έχει οστική προέλευση. Αυτό περιορίζει την χρησιμότητά της ως ειδικού δείκτη της ανακύκλωσης των οστών. Παρόλα αυτά, η οστεοκαλσίνη είναι απολύτως ειδική για τα οστά. Έχει αποδειχθεί ότι βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στις παρακάτω διαταραχές: οστεομαλάκυνση,⁷ ασθένεια των οστών του Paget,⁸ υπερθυροειδισμός,⁹ πρωτογενής υπερπαραθυροειδισμός και νεφρική οστεοδυστροφία.¹⁰ Η οστεοκαλσίνη εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα κατά την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση ανάλογα από το αν ο ρυθμός ανακύκλωσης των οστών είναι υψηλός ή χαμηλός.³ Μειωμένα επίπεδα οστεοκαλσίνης μπορούν να εντοπιστούν κατά τον υποπαραθυροειδισμό,^{11,12} ή κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας θεραπείας με κορτικοστεροειδή.^{9,13}

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ανοσοραδιομετρική μέθοδος Οστεοκαλσίνης DiaSorin (IRMA) υπολογίζει την άθικτη ανθρώπινη οστεοκαλσίνη 1-49 χωρίς διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με το θραύσμα 1-43. Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιεί την ανθρώπινη οστεοκαλσίνη 1-49 για τους βαθμονομητές και τα υλικά ελέγχου, καθώς και δύο πολυκλωνικά αντισώματα που έχουν καθαριστεί χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγενείας. Αυτά τα καθαρισμένα αντισώματα είναι ειδικά για δύο διαφορετικές περιοχές του μορίου της οστεοκαλσίνης. Το πρώτο αντίσωμα, που είναι ειδικό για το αμινικό άκρο της ανθρώπινης οστεοκαλσίνης, είναι δεσμευμένο με μία σταθερή φάση (σφαιρίδια πολυστυρενίου). Το δεύτερο αντίσωμα είναι ειδικό για το καρβόξυ-άκρο της ανθρώπινης οστεοκαλσίνης και χαρακτηρίζεται με ¹²⁵I. Τα δείγματα επωάζονται σε κοχχικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου επί 2 ώρες. Η άθικτη ανθρώπινη οστεοκαλσίνη 1-49 είναι η μοναδική μορφή οστεοκαλσίνης που θα δεσμευτεί τόσο με το αντίσωμα στο σφαιρίδιο, όσο και με το ¹²⁵I χαρακτηρισμένο αντίσωμα. Μετά από την περίοδο επώασης, κάθε σφαιρίδιο ξεπλένεται για να αφαιρεθεί το μη δεσμευμένο σημασμένο αντίσωμα. Η ραδιενέργεια που υπάρχει στο εναπομένον δεσμευμένο και σημασμένο αντίσωμα υπολογίζεται στη συνέχεια χρησιμοποιώντας μετρητή γάμμα. Η συγκέντρωση οστεοκαλσίνης 1-49 που υπάρχει στο δείγμα είναι ευθέως ανάλογη προς την υπολογισμένη ραδιενέργεια.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ

Βαθμονομητές N-Tact Osteo SP 0-5	6 φιαλίδια / 1,0 mL
Σφαιρίδια N-Tact Osteo SP	1 δοχείο/100 σφαιρίδια
¹²⁵ I Αντίσωμα I N- Tact Osteo SP	3 φιαλίδια / 11 mL
Συμπυκνωμένο Διάλυμα Πλύσης N-Tact Osteo SP	1 φιαλίδιο / 50 mL
Υλικά ελέγχου N-Tact Osteo SP	2 φιαλίδια / 1,0 mL
Αριθμός εξετάσεων	100

ΦΥΛΑΞΗ: Με την παραλαβή, το κιτ πρέπει να φυλάγεται στους 2-8°C. Φυλάξτε όλα τα ανασυσταμένα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία -15°C ή χαμηλότερη, μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξης.

Όταν ανασυστήσετε τα περιεχόμενα των φιαλιδίων, αναμίξτε απαλά για να αποφύγετε το σχηματισμό αφρού. Δεν πρέπει να αναμιγνύονται αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.

4.1 N-tact® Βαθμονομητές Osteo SP (0-5): λυοφιλιωμένο αντιδραστήριο Έξι βαθμονομητές ανθρώπινης οστεοκαλσίνης 1-49 σε ονομαστικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0 ως 200 ng/mL (0,0 nmol/L - 33,9 nmol/L). Οι βαθμονομητές πρέπει να ανασυσταθούν με 1,0 mL καθαρισμένου νερού πριν από τη χρήση. Οι ανασυσταμένοι βαθμονομητές δεν πρέπει να υπόκεινται σε περισσότερους από δύο κύκλους κατάψυξης και απόψυξης. Το κιτ DiaSorin N-tact® Osteo SP είναι κανονικοποιημένο μέσω ποσοτικής ανάλυσης των αμινοξέων. Οι βαθμονομητές του κιτ δείχνουν αντιμεταθετικότητα με τα δείγματα ασθενών όταν χρησιμοποιούνται με αντιδραστήρια και πειραματικές διαδικασίες αυτής της *in vitro* διαγνωστικής εξέτασης όπως προτείνεται.

4.2 N-tact® Υλικά ελέγχου Osteo SP, Επίπεδο 1 και Επίπεδο 2: λυοφιλιωμένο αντιδραστήριο Ρυθμισμένος και διαυγής ανθρώπινος ορός που περιέχει Trasyloi στα 400 KIU/mL και 0,1% αζίδιο του νατρίου εμπλουτισμένο με ανθρώπινη οστεοκαλσίνη 1-49. Τα υλικά ελέγχου πρέπει να ανασυσταθούν με 1,0 mL καθαρισμένου νερού πριν από τη χρήση. Τα ανασυσταμένα υλικά ελέγχου δεν πρέπει να υπόκεινται σε περισσότερους από δύο κύκλους κατάψυξης και απόψυξης.

4.3 N-tact® Σφαιρίδια Osteo SP: αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση Σφαιρίδια πολυστυρενίου επικαλυμμένα με καθαρισμένο αντίσωμα συγγενείας αίγας ειδικό για το άμινο άκρο της ανθρώπινης οστεοκαλσίνης.

4.4 ¹²⁵I N-tact® Ιχνηθέτης Osteo SP: αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση Καθαρισμένο αντίσωμα συγγενείας αίγας, ειδικό για το κάρβοξυ-άκρο της ανθρώπινης οστεοκαλσίνης, σημασμένο με ιώδιο-125 και αραιωμένο με ρυθμισμένο ορό αίγας που περιέχει νατραζίδιο 0,2% και θειική γενταμυκίνη 0,2%.

4.5 10X Διάλυμα Πλύσης: συμπυκνωμένο αντιδραστήριο 10X συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και Tween 20. Αραιώστε σε αναλογία 1:10 με καθαρισμένο νερό πριν από τη χρήση.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΓΙΑ *IN VITRO* ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Όχι για εσωτερική ή εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΛΙΚΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Χειριστείτε τα ως πιθανά μολυσματικά.

Κάθε δότης ορού/πλάσματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή αυτού το προϊόντος έχει εξεταστεί με μέθοδο εγκεκριμένη από τον FDA των ΗΠΑ και βρέθηκε αδρανής για την παρουσία HBsAg, αντισωμάτων έναντι του HCV και αντισωμάτων έναντι του HIV 1/2. Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι είναι ιδιαίτερα ακριβείς, δεν εγγυώνται την ανίχνευση όλων των μολυσμένων μονάδων. Το προϊόν αυτό μπορεί επίσης να περιέχει άλλο υλικό ανθρώπινης προέλευσης για το οποίο δεν υπάρχει εγκεκριμένη εξέταση. Επειδή καμία γνωστή μέθοδος εξέτασης δεν προσφέρει πλήρη εξασφάλιση ότι ο ιός της Ηπατίτιδας Β (HBV), ο ιός της Ηπατίτιδας Γ (HCV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) ή άλλοι ανοσοποιητικοί παράγοντες απουσιάζουν, όλα τα προϊόντα που περιέχουν τέτοια υλικά ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να γίνονται αντικείμενο μεταχείρισης σύμφωνης με τις σωστές εργαστηριακές πρακτικές και χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις, όπως αυτές ορίζονται στο εγχειρίδιο "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," των Κέντρων των Η.Π.Α. για τον Έλεγχο και την Πρόληψη των Ασθενειών / του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας, 4η έκδοση, Μάιος 1999 ή νεώτερη έκδοση.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μερικά αντιδραστήρια σε αυτό το κιτ περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με υδραυλικές εγκαταστάσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, ξεπλύνετε με άφθονο νερό για να αποτρέψετε την απόθεση αζιδίων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" (Απορρύπανση των Εργαστηριακών Εγκαταστάσεων για Απομάκρυνση Αλάτων Αζιδίων), στο Εγχειρίδιο Οδηγό-Διαχείριση Ασφάλειας (Manual Guide-Safety Management) Αρ. CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο των Ασθενειών και την Πρόληψη (Centers for Disease Control and Prevention), Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Συστάσεις Κινδύνου Επικίνδυνων Ουσιών των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων) (Οδηγία Συμβουλίου 1999/45/EC)

R20/21/22 - Επικίνδυνο κατά την εισπνοή, κατά την επαφή με το δέρμα και την κατάποση.

R32 - Η επαφή με οξέα απελευθερώνει πολύ τοξικά αέρια.

S28 - Μετά την επαφή με το δέρμα ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ-125

Αυτό το κιτ περιέχει ραδιενεργά υλικά που δεν ξεπερνούν τα 30 μCi (1110 kBq) ιωδίου-125. Πρέπει να λαμβάνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις και να ακολουθούνται σωστές εργαστηριακές πρακτικές στη φύλαξη, τον χειρισμό και την απόρριψη αυτού του υλικού.

Για τους θεραπευτές ή τα ιδρύματα που λαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Αυτό το ραδιενεργό υλικό μπορεί να λαμβάνεται, να αποκτάται, να κατέχεται και χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που ασκούν κτηνιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για *in vitro* κλινικές ή εργαστηριακές εξετάσεις που δεν περιλαμβάνουν εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού ή της ακτινοβολίας που προέρχεται από αυτό, σε ανθρώπους ή ζώα. Η λήψη, απόκτηση, κατοχή, χρήση και μεταφορά υπόκεινται σε κανονισμούς και γενική άδεια από την Ρυθμιστική Πυρηνική Επιτροπή (Nuclear Regulatory Commission) των ΗΠΑ ή την πολιτεία με την οποία η Επιτροπή έχει έρθει σε συμφωνία για την άσκηση ρυθμιστικής εξουσίας.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού πρέπει να περιοριστεί σε μια αυστηρά ορισμένη περιοχή.

2. Η πρόσβαση στα ραδιενεργά υλικά πρέπει να επιτρέπεται μόνο στο εγκεκριμένο προσωπικό.
3. Μην πιπετάρτε τα ραδιενεργά υλικά με το στόμα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε μέσα στις περιοχές όπου χειρίζεστε ραδιενεργά υλικά.
5. Οι περιοχές, όπου ενδέχεται να παρατηρηθούν διαρροές πρέπει να σκουπίζονται και στη συνέχεια να πλένονται με ένα αλκαλικό απορρυπαντικό ή με ένα διάλυμα ραδιενεργής απορρυπανσης. Οποιοδήποτε γυάλινο σκεύος χρησιμοποιείται, θα πρέπει να ξεπλένεται καλά με νερό, προτού πλυθεί μαζί με τα υπόλοιπα γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου.

Για τους θεραπευτές ή τα ιδρύματα που λαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, χρήση, μεταφορά και απόρριψη των ραδιενεργών υλικών υπόκειται στις ρυθμίσεις και τους όρους της ειδικής σας άδειας.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει ένα χημικό που είναι γνωστό στην Πολιτεία της Καλιφόρνια ως καρκινογόνο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Οι τιμές της ραδιενέργειας που αναγράφονται στο ένθετο της συσκευασίας μπορεί να διαφέρουν ελαφρώς από αυτές που αναγράφονται στην ετικέτα του κυτίου και στην ετικέτα του φιαλιδίου του ιχνηθέτη. Η ετικέτα του κυτίου και η ετικέτα του φιαλιδίου του ιχνηθέτη αναφέρουν το πραγματικό ποσοστό ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία της βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο της συσκευασίας αναφέρει το θεωρητικό ποσοστό ραδιενέργειας του kit.

6. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΦΘΟΡΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΚΙΤ

- 6.1 Αλλαγή της κλίσης ή της θέσης της καμπύλης βαθμονόμησης από το φυσιολογικό.
- 6.2 Μείωση της μέγιστης δέσμευσης.
- 6.3 Υψηλή μη ειδική μηδενική δέσμευση.
- 6.4 Χαμηλές επαναληπτικές τιμές.

7. ΔΕΙΓΜΑ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Είκοσι μικρολίτρα ορού, εις διπλούν, απαιτούνται για χρήση με το kit N-tact® Osteo SP. Η οστεοκαλσίνη έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει μια χαρακτηριστική ημερήσια διακύμανση με μέγιστο επίπεδο τη νύχτα και ελάχιστο επίπεδο αργά το πρωί ή νωρίς το απόγευμα.¹⁴ Για το λόγο αυτό, η συλλογή θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Συλλέξτε το αίμα μέσω διάτρησης της φλέβας σε κενό γυάλινο σωληνάριο των 5 ή 10 mL. Αφήστε το αίμα να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Περιστρέψτε τα δείγματα αίματος επί δεκαπέντε λεπτά σε κατεψυγμένη συσκευή φυγοκέντρησης για να λάβετε ορό χωρίς αιμόλυση. Διαχωρίστε εγκαίρως τον ορό από τα κύτταρα και καταψύξτε αμέσως. Όλα τα πλαστικά, γυάλινα ή άλλα σκεύη που έρχονται σε επαφή με το δείγμα δεν θα πρέπει να είναι επιμολυσμένα. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν μέχρι 6 μήνες σε θερμοκρασία -20°C. Αν χρειαστεί να τα αποθηκεύσετε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -70°C ή χαμηλότερη.

8. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- 8.1 Αναλώσιμα σωληνάκια από βοροπυριτικό γυαλί, 12 x 75 mm.
- 8.2 Στατήρας δοκιμαστικών σωληναρίων.
- 8.3 Βαθμονομημένος μετρητής γάμμα, με δυνατότητα υπολογισμού 125-Ιωδίου.
- 8.4 Συσκευή ανάδευσης.
- 8.5 Συσκευές πιπεταρίσματος:
 - a. Μικρο-ρύγχος διανομής βαθμονομημένο, ώστε να διανέμει 20 µL.
 - b. Δοχεία επανάληψης βαθμονομημένα, ώστε να διανέμουν 300 µL και 1 mL.
 - c. Ογκομετρικές πιπέτες για την ανασύσταση των υλικών ελέγχων και των βαθμονομητών.

- 8.6 Parafilm ή αντίστοιχο υλικό για την επικάλυψη των δοκιμαστικών σωληναρίων.
- 8.7 Λαβίδες καλυμμένες με τεφλόν ή άλλη συσκευή συμβατή με το kit για τη διανομή των σφαιριδίων.
- 8.8 Μονάδα αναρρόφησης για την αναρρόφηση ¹²⁵I των αντισωμάτων και του διαλύματος πλύσης.
- 8.9 Κογχικός αναδευτήρας με δυνατότητα 190 ± 10 rpm με κογχική διάμετρο περίπου 2 cm.
- 8.10 Καθαρισμένο νερό.
- 9. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**
- 9.1 Ανασύσταση των λυοφιλωμένων αντιδραστηρίων και αραίωση του Διαλύματος Πλύσης 10X (βλ. Ενότητα Αντιδραστήρια). Αναμίξτε καλά τους ανασυσταμένους βαθμονομητές και υλικά ελέγχου. Επιτρέψτε στον ιχνηθέτη και στα σφαιρίδια να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Επιτρέψτε στα καταψυγμένα δείγματα να αποψυχθούν εντελώς. Διατηρήστε τους βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα αποψυγμένα δείγματα στον πάγο, όσο προετοιμάζετε την ανάλυση.
- 9.2 Ετοιμάστε τα σημασμένα σωληνάρια από βοροπιρηνικό γυαλί 12 x 75 mm εις διπλούν, σύμφωνα με το σχέδιο της ανάλυσης στην πίσω σελίδα.
- 9.3 Προσθέστε αντιδραστήρια στα σωληνάρια, ως εξής:
- Βαθμονομητής 0**
20 μL Βαθμονομητή 0
300 μL Ιχνηθέτη (κόκκινου)
 - Βαθμονομητές (A-E)**
20 μL Βαθμονομητή
300 μL Ιχνηθέτη (κόκκινου)
 - Υλικά ελέγχου και άγνωστα δείγματα**
20 μL υλικό ελέγχου ή άγνωστου δείγματος
300 μL Ιχνηθέτη (κόκκινου)
 - Σωληνάρια συνολικής μέτρησης**
300 μL Ιχνηθέτη (κόκκινου)
- 9.4 Αναδεύστε όλα τα σωληνάρια.
- 9.5 Τοποθετήστε ένα σφαιρίδιο σε κάθε σωληνάριο (ΕΚΤΟΣ από τα Σωληνάρια Συνολικής Μέτρησης) με λαβίδες καλυμμένες από τεφλόν ή κατάλληλη συσκευή χορήγησης σφαιριδίων. (Μην χρησιμοποιείτε τα δάχτυλά σας.)
- 9.6 Καλύψτε τα σωληνάρια με parafilm ή αντίστοιχο υλικό.
- 9.7 Αναδεύστε τα σωληνάρια σε κογχικό αναδευτήρα στα 190 ± 10 rpm επί 2 ώρες \pm 5 λεπτά σε θερμοκρασία 20 - 25°C.
- 9.8 Αναρροφήστε το μίγμα αντίδρασης από το κάθε σωληνάριο (ΕΚΤΟΣ από τα σωληνάρια Συνολικής Μέτρησης).
- 9.9 Εκπλύνετε τα σφαιρίδια ρίχνοντας με ορμή 1 mL αραιωμένου Διαλύματος Πλύσης σε κάθε σωληνάριο (ΕΚΤΟΣ από τα σωληνάρια Συνολικής Μέτρησης) με αρκετή δύναμη, ώστε να σηκωθεί το σφαιρίδιο από τον πυθμένα του δοκιμαστικού σωληναρίου. Αναρροφήστε Διάλυμα Πλύσης. Επαναλάβετε τη διαδικασία πλύσης δυο φορές ακόμα.
- 9.10 Υπολογίστε την ραδιενέργεια που υπάρχει σε κάθε σωληνάριο χρησιμοποιώντας μετρητή γάμμα.
- 10. ΣΧΟΛΙΑ ΕΠΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ**
- 10.1 Αναλύστε όλα τα δείγματα εις διπλούν για να εξασφαλίσετε την αξιοπιστία των τιμών που λάβατε.
- 10.2 Τοποθετήστε με πιπέτα τα δείγματα και τον ιχνηθέτη στο κάτω ένα τρίτο του δοκιμαστικού σωληναρίου.

- 10.3** Όταν προσθέτετε σφαιρίδια στα σωληνάρια, γείρετε ελαφρά το στατήρα των δοκιμαστικών σωληναρίων και αφήστε τα σφαιρίδια να κυλήσουν στα σωληνάρια. Αυτό θα αποτρέψει την υπερχειλίση του διαλύματος δοκιμής. Μη χειρίζεστε τα σφαιρίδια μετά δάχτυλά σας.
- 10.4** Όταν χρησιμοποιείτε αναδευτήρα με κογχική διάμετρο μικρότερη των 2 cm, προσαρμόστε την ταχύτητα ανάλογα, ώστε να επιτρέψετε την έντονη ανάδευση.
- 10.5** Για την πλήρη παρακολούθηση της συνεπούς απόδοσης μιας ανάλυσης IRMA, υπάρχουν επιπρόσθετοι παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να ελεγχθούν. Η DiaSorin συνιστά τον έλεγχο των ακόλουθων παραμέτρων.

- a. Συνολική Μέτρηση**
b. % Μέγιστη Δέσμευση

$$\frac{(\text{CPM Βαθμονομητή E} - \text{CPM Βαθμονομητή 0})}{(\text{CPM Συνολικών Μετρήσεων} - \text{CPM Βαθμονομητή 0})} \times 100$$

- c. Μη ειδική δέσμευση**
 CPM Σωληναρίων του Βαθμονομητή 0

- 10.6** Για να μετατρέψετε ng/mL σε nmol/L, $\text{ng/mL} \times 0,1695 = \text{nmol/L}$.

11. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα υλικό ελέγχου υψηλής συγκέντρωσης κι ένα υλικό ελέγχου χαμηλής συγκέντρωσης σε κάθε ανάλυση για να παρακολουθεί την απόδοση της ανάλυσης. Τα υλικά ελέγχου που παρέχονται με το kit μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτό. Τα υλικά ελέγχου των kit περιέχουν οστεοκαλσίνη τόσο στις υψηλές, όσο και στις χαμηλές συγκεντρώσεις και έχουν αναλυθεί χρησιμοποιώντας το kit DiaSorin N-tact® Osteo SP για την απόκτηση των αναμενόμενων τιμών. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων. Τα υλικά ελέγχου πρέπει να υπόκεινται σε μεταχείριση, όπως και τα άγνωστα δείγματα και να αναλύονται εις διπλούν. Οι αναλύσεις πρέπει να θεωρούνται έγκυρες μόνο εφόσον τα αποτελέσματα ανταποκρίνονται στα κριτήρια του εργαστηρίου.

12. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Προκειμένου να οριστεί η συγκέντρωση Οστεοκαλσίνης που υπάρχει στα υλικά ελέγχου και στα άγνωστα δείγματα, δημιουργείται μια καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία χρησιμοποιεί τις συγκεντρώσεις των βαθμονομητών που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Οι τιμές δημιουργούνται ως εξής:

- 12.1** Υπολογίστε τον μέσο CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και άγνωστο δείγμα.
- 12.2** Αφαιρέστε τον μέσο CPM των σωληναρίων του βαθμονομητή 0 από όλες τις μετρήσεις του μέσου όρου, προκειμένου να αποκτήσετε διορθωμένες τιμές CPM.
- 12.3** Οι επαναλήψεις των μετρήσεων πρέπει να επαρκούν για τη μείωση των στατιστικών σφαλμάτων (για παράδειγμα η συγκέντρωση 2.000 μετρήσεων θα αποφέρει 5% εσφαλμένα αποτελέσματα, ενώ οι 10.000 μετρήσεις θα έχουν 1% εσφαλμένα αποτελέσματα).
- 12.4** Χρησιμοποιώντας λογαριθμικό χαρτί (log-log), καταγράψτε την διορθωμένη CPM για κάθε επίπεδο του βαθμονομητή στην τεταγμένη και την συγκέντρωση του βαθμονομητή στην τετμημένη.
- 12.5** DiaSorin χρησιμοποιεί τη μέθοδο εξομάλυνσης για μείωση των δεδομένων.
- 12.6** Παρεμβάλετε τα επίπεδα της Οστεοκαλσίνης στα δείγματα από την καταγραφή.

- 12.7** Αν ένα άγνωστο δείγμα έχει μεγαλύτερες ενδείξεις από τον υψηλότερο βαθμονομητή, πρέπει να αραιωθεί κατάλληλα με τον βαθμονομητή 0 και να αναλυθεί εκ νέου.
- 12.8** Αν αραιωθεί ένα άγνωστο δείγμα, διορθώστε για να συμπεριλάβετε τον κατάλληλο συντελεστή αραιώσης.

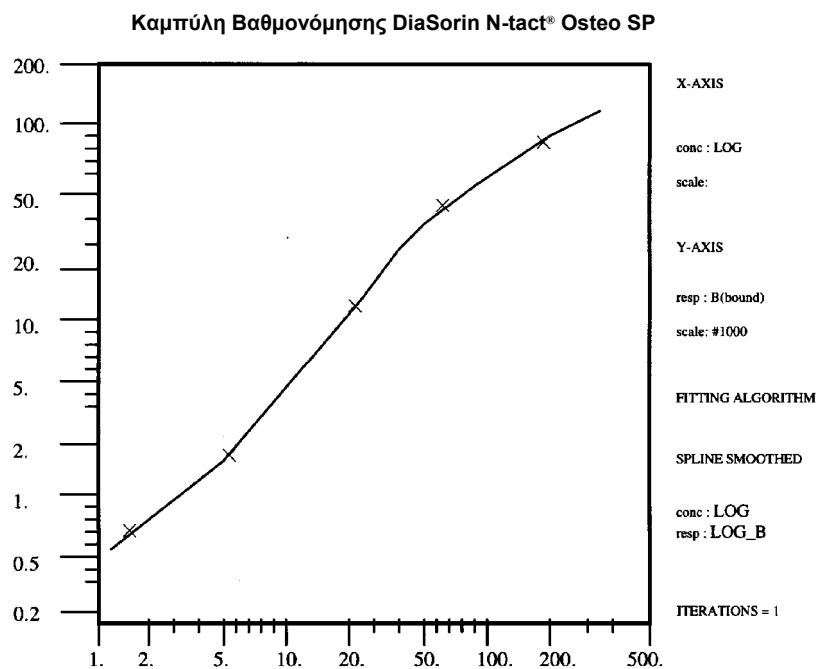
13. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ N-TACT® OSTEO SP

τα τυπικά δεδομένα δείγματος καθώς και μια καμπύλη βαθμονόμησης για το N-tact® Osteo SP φαίνονται στον ΠΙΝΑΚΑ Ι και την ΕΙΚΟΝΑ Ι αντίστοιχα. Αυτές οι πληροφορίες χρησιμοποιούνται ως μέσο αναφοράς και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό καμίας τιμής.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Δεδομένα Δείγματος DiaSorin N-tact Osteo SP

Σωληνάριο	Αντίγραφο CPM	Μέσος όρος CPM	Διορθωμένο CPM	Συμπ. (ng/mL)
Συνολική Μέτρηση	307358 306568	306963		
0 Βαθμονομητής	282 240	261		
Βαθμονομητές (ng/mL) [nmol/L]				
A (1,5) [0,25]	915 1020	968	707	
B (5,0) [0,85]	2146 1956	2051	1790	
C (20) [3,39]	10623 10226	10425	10164	
D (60) [10,2]	33102 33775	33438	33177	
E (200) [33,9]	78471 77768	78120	77859	
Άγνωστα Δείγματα				
1	1057 1081	1069	808	1,88
2	2401 2205	2303	2042	5,66
3	25772 24402	25087	24826	44,00



ΣΧΗΜΑ 1

14. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Εύρος Αναφοράς

Κάθε εργαστήριο πρέπει να ορίσει το δικό του εύρος αναφοράς. Σε μελέτες που διεξήχθησαν από την DiaSorin, τα δείγματα ορού από σαράντα-επτά φαινομενικά υγιείς ενήλικες συλλέχθηκαν από τις 7 ως τις 10 π.μ. Οι άντρες είχαν ηλικία μεταξύ 23 και 51 ετών, ενώ οι γυναίκες πριν από την εμμηνόπαυση μεταξύ 26 και 50 ετών. Η ανάλυση των δειγμάτων αυτών έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

	ΠΙΝΑΚΑΣ II	
	ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΟΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
	(ng/mL)	(ng/mL)
Άντρες (n = 21)	6,25 [1,05 nmol/L]	3,2-12,2 [0,54-2,07 nmol/L]
Γυναίκες (n = 26)	5,58 [0,94 nmol/L]	2,7-11,5 [0,46-1,95 nmol/L]

15. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

15.1 Αναλυτική Εξειδίκευση

Το kit DiaSorin N-tact® Osteo SP υπολογίζει μόνο την άθικτη ανθρώπινη οστεοκαλσίνη 1-49. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στην ανθρώπινη οστεοκαλσίνη 1-43 είναι < 0,01%.

15.2 Ακρίβεια

ΠΙΝΑΚΑΣ III

Εντός της Διακύμανσης της Ανάλυσης (τιμές = ng/mL)

Ακρίβεια Εντός της Ανάλυσης

Δείγμα	Μέση Τιμή (n = 20)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,14	6,3
2	4,98	0,27	5,4
3	40,76	1,83	4,5

ΠΙΝΑΚΑΣ IV

Μεταξύ των Διακυμάνσεων της Ανάλυσης (τιμές = ng/mL)

Ακρίβεια Μεταξύ των Αναλύσεων

Δείγμα	Μέση Τιμή (n = 10)	S.D.	%C.V.
1	2,21	0,20	9,0
2	5,05	0,36	7,1
3	42,10	4,01	9,5

15.3 Πιστότητα: Η πιστότητα της ανάλυσης έχει ελεγχθεί μέσω ελέγχου γραμμικότητας και ελέγχου ανάκτησης.

Γραμμικότητα (Παραλληλισμός)

ΠΙΝΑΚΑΣ V

Μελέτη της Σειριακής Αραίωσης τριών Δειγμάτων Ασθενών (τιμές = ng/mL)

Δείγμα	Μη Αραιωμένο	1/2	1/4	1/8
1	29,2	15,6	7,6	3,8
2	43,1	23,5	12,2	6,0
3	68,3	33,4	16,6	8,6

Ακρίβεια

ΠΙΝΑΚΑΣ VI

Μελέτη Ανάκτησης τριών Δειγμάτων Ασθενών Εμπλουτισμένων με Οστεοκαλσίνη 1049 (τιμές = ng/mL)

Δείγμα Αριθμός	Προστιθέμενος	Τιμή Υπολογισμένος	Ποσοστό % Ανάκτηση
1	0	2,5	100
	9,6	11,9	98
	29,7	30,9	96
	61,4	50,4	78
2	0	4,8	100
	9,6	13,7	93
	29,7	33,2	96
	61,4	62,8	94
3	0	3,1	100
	9,6	12,6	99
	29,7	33,0	101
	61,4	57,2	88

15.4 Αναλυτική Ευαισθησία

Τρεις ιχνηθέτες (όλοι οχτώ μέρες πριν από την ιωδίωση) χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της ευαισθησίας της ανάλυσης. Η μέθοδος backfit της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε κατά την οποία υπολογίζεται ο CPM σε 2 τυπικές αποκλίσεις από το βαθμονομητή 0 και η τιμή αυτή διαβάζεται ως άγνωστη εκτός της γραμμής βαθμονόμησης.

Βάσει των παραπάνω μελετών, η ευαισθησία του kit N-tact® Osteo SP έχει οριστεί σε 0,2 ng/mL (0,034 nmol/L).

ΒΛ. ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ ΓΙΑ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΣΧΕΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1. Ανασυστήστε τα λυοφιλιωμένα αντιδραστήρια και επιτρέψτε σε όλα τα καταψυγμένα δείγματα να αποψυχθούν εντελώς. Διατηρήστε τα αντιδραστήρια και τα αποψυγμένα δείγματα στον πάγο, ενώ προετοιμάζετε την ανάλυση.
2. Αναγνωρίστε τα σωληνάρια εις διπλούν.
3. Χορηγήστε αντιδραστήρια σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα.










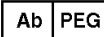




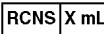



Σωληνάρια/Αντιδραστήρια	Συνολική Μέτρηση	Βαθ 0-5	Υλικά ελέγχου και άγνωστα δείγματα
Βαθμονομητές	-	20 µL	-
Υλικά ελέγχου	-	-	20 µL
Άγνωστα Δείγματα	-	-	20 µL
Ιχνηθέτης	300 µL	300 µL	300 µL

4. Αναμίξτε καλά.
5. Χορηγήστε από ένα σφαιρίδιο σε όλα τα σωληνάρια (ΕΚΤΟΣ από τα Σωληνάρια Συνολικής Μέτρησης).
6. Καλύψτε τα σωληνάρια με parafilm, αναδεύστε τα σωληνάρια σε 190 +/- 10 rpm επί 2 ώρες +/- 5 λεπτά στους 20-25°C.
7. Αναρροφήστε το μίγμα αντίδρασης από το κάθε σωληνάριο εκτός από τα σωληνάρια συνολικής μέτρησης.
8. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια ρίχνοντας με ορμή 1 mL αραιωμένου διαλύματος πλύσης σε κάθε σωληνάριο με αρκετή δύναμη, ώστε να σηκωθεί το σφαιρίδιο από τον πυθμένα του δοκιμαστικού σωληναρίου. Αναρροφήστε διάλυμα πλύσης. Επαναλάβετε τη διαδικασία της έκπλυσης 2 φορές.
9. Μετρήστε κάθε σωληνάριο σε μετρητή γάμμα.

**REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/
REFERÊNCIAS/REFERENSER/BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**









1. Poser, J.W., F.S. Esch, N.C. Ling and P.A. Price, "Isolation and Sequence of the Vitamin K Dependent Protein from Human Bone: Undercarboxylation of the First Glutamic Acid Residue," **Journal of Biological Chemistry**, 255: 8685-8691 (1980).
2. Price, P.A., M.K. Williamson and J.W. Lothringer, "Origin of the Vitamin K Dependent Bone Protein Found in Plasma and Its Clearance by Kidney and Bone," **Journal of Biological Chemistry**, 256: 12760-12766 (1981).
3. Civitelli, R., S. Gonnelli, F. Zacchei, S. Bigazzi, A. Vattimo, L.V. Avioli and C. Gennari, "Bone Turnover in Postmenopausal Osteoporosis: Effects of Calcitonin Treatment," **Journal of Clinical Investigation**, 82: 1268-1274 (1988).
4. Caniggia, A., R. Nuti, M. Galli, F. Lore, V. Turchetti and G.A. Righi, "Effect of a Long-Term Treatment with 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis," **Calcified Tissue International**, 38: 328-332 (1986).
5. Zerwekh, J.E., K. Sakhaee and C.Y. Pak, "Short-Term 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Administration Raises Serum Osteocalcin in Patients with Postmenopausal Osteoporosis," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 60: 615-617 (1985).
6. Kerner, S.A., R.A. Scott and J.W. Pike, "Sequence Elements in the Human Osteocalcin Gene Confer Basal Activation and Inducible Response to Hormonal Vitamin D₃," **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.**, 86: 4455 (1989).
7. Demiaux, B., M.E. Arlot, M. Chapuy, P.J. Meunier and P.D. Delmas, "Serum Osteocalcin is Increased in Patients with Osteomalacia: Correlations with Biochemical and Histomorphometric Findings," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 74 (5): 1146-1151 (1992).
8. Merle, B. and P.D. Delmas, "Normal Carboxylation of Circulating Osteocalcin (bone gla protein) in Paget's Disease of the Bone," **Bone and Mineral**, 11: 237-245 (1990).
9. Lukert, B.P., J.C. Higgins and M.M. Stoskopf, "Serum Osteocalcin is Increased in Patients with Hyperthyroidism and Decreased in Patients Receiving Glucocorticoids," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 62: 1056-1058 (1986).
10. Charhon, S.A., P.D. Delmas and L. Malaval, "Serum Bone GLA Protein in Renal Osteodystrophy: Comparison with Bone Histomorphometry," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 63: 892-897 (1986).
11. Duda, R.J.J., J.F. O'Brien, J.A. Katzmann, J.M. Peterson, K.G. Mann and B.L. Riggs, "Concurrent Assays of Bone Gla Protein and Bone Alkaline Phosphatase: Effects of Sex, Age, and Metabolic Bone Disease," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 66: 951-957 (1988).
12. Kruse, K., U. Kracht, K. Wohlfart and U. Kruse, "Biochemical Markers of Bone Turnover, Intact Serum Parathyroid Hormone and Renal Excretion in Patients with Pseudohypoparathyroidism and Hypoparathyroidism Before and During Vitamin D Treatment," **European Journal of Pediatrics**, 148: 535-539 (1989).
13. Ekenstam, E.A., S. Ljunghall and R. Hallgren, "Serum Osteocalcin in Rheumatoid Arthritis and other Inflammatory Arthritides: Relation Between Inflammatory Activity and the Effect of Glucocorticoids and Remission Inducing Drugs," **Ann. Rheum. Dis.**, 45: 484-490 (1986).
14. Gundberg, C.M., M.E. Markowitz, M. Mizuchi and J.F. Rosen, "Osteocalcin in Human Serum: A Circadian Rhythm," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 60: 736-739 (1985).b

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Maximum temperature	Température maximale	Höchsttemperatur	Temperatura máxima	Temperatura massima
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisero	Antisiero
	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
	Tracer: antigen labelled with ¹²⁵ I	Traceur : antigène marqué à l'iode ¹²⁵	Tracer: ¹²⁵ I-markiertes Antigen	Trazador: antigeno etiquetado con ¹²⁵ I	Tracciatore: antigene etichettato con ¹²⁵ I
	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
	Wash buffer	Tampon de lavage	Waschpuffer	Tampón de lavado	Tampone di lavaggio
	Reconstitute with X mL	Reconstituer avec X mL	Mit X mL auflösen	Reconstitución con X mL	Ricostituire con X mL
	Coated beads	Billes enduites	Beschichtete Kügelchen	Perlas recubiertas	Perle con rivestimento
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radioactivo	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheitsschädlich	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Prazo de validade	Utgångsdatum	Ημερομηνία Λήξης
	Fabricante	Tilverkare	Κατασκευαστής
	Consulte as instruções de utilização	Se bruksanvisningen	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
IVD	Diagnóstico in vitro.	Diagnostik in vitro.	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
LOT	N.º do lote	Batch-nummer	Αρ. παρτίδας
	Temperatura máxima	Max. temperatur	Ανώτερο όριο θερμοκρασίας
	Limite de temperatura.	Temperatur-begränsning.	Περιορισμοί θερμοκρασίας
Ab	Anti-soro	Antiserum	Αντιορός
Ab PEG	Precipitado no reagente	Utfällningsreagens	Αντιδραστήριο καθίζησης
Ab ¹²⁵I	Traçador: antígeno marcado com ¹²⁵ I	Spårelement: antikropp betecknad med ¹²⁵ I	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σημασμένο με ¹²⁵ I
CAL	Calibrador	Kalibrator	Βαθμονομητής
CONTROL	Soro de controlo	Kontrollserum	Ορός μάρτυρα
BUF WASH 10X	Tampão de lavagem	Tvätta buffert	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
RCNS X mL	Reconstituir com X mL	Rekonstituera med X mL	Ανασύσταση με X mL
SORB	Pérolas revestidas	Belagda strängar	Επικαλυμμένες χάντρες
	Radioactivo	Radioaktiv	Ραδιενεργό
	Nocivo	Skadligt	Επιβλαβής



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
+44(0) 1344 401 430
FAX: +44(0) 7884 050812

15744

34688
7/10

PRINTED IN U.S.A.

