



## Instructions for Use

# Osteocalcin IRMA

IVD



REF RIA-3651

$\Sigma$  96



**DRG**

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



**DRG**

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

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabla de Contenidos**

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

1	INSTRUCCIONES DE USO.....	15
2	INFORMACIÓN CLÍNICA.....	15
3	PRINCIPIOS DEL MÉTODO.....	15
4	REACTIVOS SUMINISTRADOS.....	15
5	MATERIAL NO SUMINISTRADO.....	16
6	PREPARACIÓN REACTIVOS .....	16
7	ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS .....	16
8	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	16
9	PROTOCOLO .....	17
10	CALCULO DE RESULTADOS .....	17
11	EJEMPLO DE RESULTADOS .....	17
12	REALIZACIÓN Y LIMITACIONES.....	18
13	LIMITACIONES.....	19
14	CONTROL DE CALIDAD INTERNO .....	19
15	INTERVALOS DE REFERENCIA.....	19
16	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS .....	20
17	RESUMEN DEL PROTOCOLO.....	20
18	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA.....	21
	SYMBOLS USED.....	22

## 1 INTENDED USE

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

## 2 CLINICAL BACKGROUND

### 2.1 Biological activities

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

### 2.2 Clinical application

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

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

## 3 PRINCIPLES OF THE METHOD

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

## 4 REAGENTS PROVIDED

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

- Note:**
1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
  2. The origin of the osteocalcin for the preparation of the calibrators is recombinant.

## 5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Trasylo<sup>®</sup> at 10000 IU/mL
3. Pipettes for delivery of: 50 µL, 500 µL and 1 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
4. Vortex mixer
5. Tube shaker (400 rpm)
6. Magnetic stirrer
7. Refrigerated centrifuge
8. 5 mL automatic syringe (Cornwall type) for washing
9. Aspiration system (optional)
10. Any gamma counter capable of measuring <sup>125</sup>I may be used (minimal yield 70%).

## 6 REAGENT PREPARATION

### A. Calibrator :

Reconstitute the zero calibrator with 1.0 mL distilled water and other calibrators with 0.5 mL distilled water.

### B. Controls :

Reconstitute the controls with 0.5 mL distilled water.

### C. Working Wash solution :

Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

## 7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 °C - 8 °C.
- After reconstitution, calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20 °C. Freezing should be performed immediately after use, do not wait for freezing until all the samples are pipetted. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 °C - 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

## 8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or heparin and EDTA plasma provide similar results.

Collect blood by venipuncture, taking care to avoid hemolysis, the samples must be kept in an ice bath. Separate the plasma or serum from the cells within 3 hours, the use of a refrigerated centrifuge is recommended. Add 100 µL Trasylo<sup>®</sup> (10000 IU/mL) to the plasma or serum immediately after centrifugation (to obtain 1000 IU Trasylo<sup>®</sup> per mL sample).

With this treatment the samples are stable for 3 days at 2 °C - 8 °C. For a longer delay the samples have to be frozen (-20 °C), however the samples can only be thawed once! For repeat testing freeze the samples in aliquots and discard each sample after the first thawing.

Do not use citrate plasma, hemolyzed samples or lipemic samples.

## 9 PROCEDURE

### 9.1 Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

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

### 9.2 Procedure

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

## 10 CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of OST (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. If Trasylo<sup>®</sup> is added to the samples (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), sample values have to be multiplied by 1.1.

## 11 TYPICAL DATA

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

Osteocalcin-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		160142	100
Calibrator	0.0 ng/mL	197	0.12
	1.9 ng/mL	2050	1.27
	4.5 ng/mL	5467	3.40
	19.5 ng/mL	26254	16.31
	46.0 ng/mL	60957	37.86
	69.0 ng/mL	86764	53.89

## 12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### 12.1 Detection limit

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

### 12.2 Specificity

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

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

### 12.3 Precision

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

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

### 12.4 Accuracy

#### RECOVERY TEST

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

#### DILUTION TEST

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

Samples were diluted with zero calibrator.

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

**12.5 Time delay between last calibrator and sample dispensing**

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

**TIME DELAY**

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

**12.6 Hook-effect**

A sample spiked with OST up to 1000 ng/mL gives higher counts than the last calibrator point.

**13 LIMITATIONS**

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays.  
Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophelic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.  
If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

**14 INTERNAL QUALITY CONTROL**

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

**15 REFERENCE INTERVALS**

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

Healthy subjects obtained values ranging from 5 to 25 ng/mL (2.5 to 97.5 percentiles).

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



**16 PRECAUTIONS AND WARNINGS****Safety**

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

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

**17 SUMMARY OF THE PROTOCOL**

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

## 1 VERWENDUNGSZWECK

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

## 2 KLINISCHER HINTERGRUND

### 2.1 Biologische Aktivität

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

### 2.2 Klinische Anwendung

Die Bestimmung der Blutwerte von Osteocalcin ist nützlich für:

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

## 3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

## 4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
<b>TUBES</b>	Mit anti OST- beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>Ab <sup>125</sup>I</b>	Tracer: <sup>125</sup> Iodmarkierter Anti-OST (monoklonale Antikörper) in TRIS puffer mit Rinderserum- albumin, Azid (<0,1%), EDTA, Proteaseinhibitoren und inertem roten Farbstoff	1 Gefäß 5,5 mL 440 kBq	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>CAL 0</b>	Null Kalibrator in Osteocalcin-freiem Humanplasma mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	1 Gefäß lyophil.	1 mL dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>CAL N</b>	Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Osteocalcin-freiem Humanplasma mit Benzamidin und Proteaseinhibitoren	5 Gefäße lyophil.	0,5 mL dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>WASH SOLN CONC</b>	Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 mL	70 x mit dest. Wasser <b>verdünnen</b> (Magnetrührer benutzen).
<b>CONTROL N</b>	Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mitThymol, Benzamidin und Proteaseinhibitoren	2 Gefäße lyophil.	0,5 mL dest. Wasser <b>zugeben</b>

### Bemerkung:

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

## 5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

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

## 6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

### A. Kalibratoren :

Rekonstituieren Sie den Null Kalibrator mit 1,0 mL dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 0,5 mL dest. Wasser.

### B. Kontrollen :

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 mL dest. Wasser.

### C. Waschlösung:

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

## 7 AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C stabil.
- Die Kalibratoren und Kontrollen sind sehr instabil, sie sind sofort nach der Rekonstitution zu verwenden. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren werden. Sofort nach Gebrauch einfrieren, mit dem Einfrieren nicht warten, bis alle Proben pipettiert sind.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2 °C bis 8 °C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

## 8 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Serumproben, EDTA oder heparinisieretes Plasma liefern ähnliche Ergebnisse.

Blutabnahme durchführen, dabei auf Vermeidung einer Hämolyse achten. Die Proben müssen in einem Eisbad gelagert werden. Plasma oder Serum sollten innerhalb von 3 Stunden von den Zellen separiert werden, die Nutzung einer Kühlzentrifuge ist ratsam. Unmittelbar nach der Zentrifugation sind dem Plasma bzw. Serum 100 µL Trasylol® (10.000 IE/mL) hinzuzufügen (um 1.000 IE Trasylol® pro mL Probe zu erhalten).

Mittels dieser Behandlung sind die Proben bis zu 3 Tagen bei 2 °C - 8 °C stabil. Zur längeren Lagerung Proben sofort bei -20 °C einfrieren, die Proben können jedoch nur einmal aufgetaut werden! Zum wiederholten Messen Proben aliquotiert einfrieren und Aliquote nach Gebrauch wegwerfen.

Zitratplasma, hämolytische oder lipämische Proben nicht verwenden!

## 9 DURCHFÜHRUNG

### 9.1 Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

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

### 9.2 Durchführung

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

## 10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration OST (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Wenn den Proben Trasyol® zugesetzt wird (100 µL/mL), müssen die Probenwerte mit 1,1 multipliziert werden.

## 11 TYPISCHE WERTE

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

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

## 12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### 12.1 Nachweisgrenze

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

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,22 ng/mL.

### 12.2 Spezifität

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

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

### 12.3 Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### 12.4 Genauigkeit

#### WIEDERFINDUNGSTEST

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

#### VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.

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

**12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

**ZEITABSTAND**

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

**12.6 Hook-Effekt**

Eine Probe mit OST bis zu 1000 ng/mL liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

**13 ANWENDUNGSGRENZEN**

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren.

Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden.

Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

**14 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE**

Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.

Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.

Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

**15 REFERENZ INTERVALLE**

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

Gesunde Personen erzielten Werte von 5 bis 25 ng/mL (2,5 bis 97,5 Perzentilen).

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

**16 VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN**Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält  $^{125}\text{I}$  (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35.5 keV) Strahlungen emittiert. Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

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

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

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

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

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

**17 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

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

## 1 INSTRUCCIONES DE USO

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

## 2 INFORMACIÓN CLÍNICA

### 2.1 Actividades biológicas

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

### 2.2 Aplicaciones clínicas

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

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

## 3 PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

## 4 REACTIVOS SUMINISTRADOS

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

### Nota:

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



## 5 MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Trasylo<sup>®</sup> a 10000 UI/mL
3. Pipetas de 50 µL, 500 µL y 1 mL (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
4. Vortex
5. Agitador de tubos (400 rpm)
6. Agitador magnético
7. Centrifuga refrigerada
8. Jeringa automática 5 mL (tipo Cornwall) para el lavado
9. Sistema de aspiración (opcional)
10. Contador de radiaciones gamma para medir I<sup>125</sup> (mínima eficiencia 70%)

## 6 PREPARACIÓN REACTIVOS

### A. Calibradores :

Reconstituir el calibrador cero con 1,0 mL de agua destilada y otros calibradores con 0,5 mL de agua destilada.

### B. Controles:

Reconstituir los controles con 0,5 mL de agua destilada.

### C. Solución de lavado de trabajo:

Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

## 7 ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2 °C - 8 °C.
- Después de la reconstitución los calibradores y los controles son muy inestables, utilizar inmediatamente después de la reconstitución. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a -20 °C. Congelar inmediatamente después del uso, no esperar a que todas las muestras sean preparadas
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2 °C - 8 °C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

## 8 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

## 9 PROTOCOLO

### 9.1 Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

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

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

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

### 9.2 Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µL de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 50 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante ( 400 rpm).
6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de las Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 mL de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de las Cuentas Totales)
9. Lavar de nuevo con 2 mL de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante..
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

## 10 CALCULO DE RESULTADOS

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

## 11 EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

## 12 REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### 12.1 Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,22 ng/mL.

### 12.2 Especificidad

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

Hormona añadida	OST CAL 1 ng/mL	OST CAL 2 ng/mL
-	20	100
Fragmento N-terminal 1-18 at 28 mM	18,5	125
Fragmento C-terminal a 5.5 mM	19,2	97

### 12.3 Precisión

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

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

### 12.4 Exactitud

#### TEST DE RECUPERACIÓN

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

#### TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilucion	Concent. Terica (ng/mL)	Concent. Medida (ng/mL)
A	1/1	-	60,5
	1/2	30,3	29,0
	1/4	15,1	12,7
	1/8	7,6	6,7
	1/16	3,8	3,6
	1/32	1,9	2,0

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

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

## 12.5 Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

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

### TIEMPO DE ESPERA

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

## 12.6 Efecto "hook"

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

## 13 LIMITACIONES

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

## 14 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

## 15 INTERVALOS DE REFERENCIA

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

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

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

## 16 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene  $I^{125}$  (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35.5 keV) ionizantes.

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

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

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

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

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

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

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
















## 17 RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

**18 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA**

1. J.P. BROWN, P.D. DELMAS and al. (May 19, 1984) **"Serum BGP : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis"**. The Lancet, 1091-1093.
2. P.A. PRICE. (1985) **"Vitamin K-dependent formation of osteocalcin and its function"**. Vitamins and hormones, 42,65-108.
3. R.E. COLEMAN, G. MASHITER and al. (1988) **"Osteocalcin : a potential marker of metastatic bone disease and response to treatment"**. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 24,1211-1217.
4. S. MINISOLA and al. (1988) **"Serum osteocalcin in primary hyperparathyroidism : short-term effect of surgery"**. Mineral Electrolyte Metab., 14,201-207.
5. L.A. COULTON, C.J. PRESTON and al. (1988) **"An evaluation of serum osteocalcin in Paget's disease of bone and its response to diphosphonate treatment"**. Arthritis and Rheumatism, 31,9,1142-1147.
6. J.S. JOHANSEN, S.B. JENSEN and al. (1990) **"Serum BGP : a potential marker of GH deficiency and the response to GH therapy"**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 71,1,122-126.
7. M.J. POWER and P.F. FOTTRELL. (1991) **"Osteocalcin : Diagnostic Methods and Clinical Applications"**. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 28,4,287-335.
8. B. DEMIAUX, M.E. ARLOT and al. (1992) **"Serum osteocalcin is increased in patients with biochemical and histomorphometric findings"**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 74,5,1146-1151.
9. J.C. DUMON, H. WANTIER, F. MATHIEU, M. MANTIA and J.J. BODY. (1996) **Technical and clinical validation of a new immunoradiometric assay for human osteocalcin**. European Journal of Endocrinology, 135,231-237.

## SYMBOLS USED

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