

## **N-MID<sup>®</sup> Osteocalcin ELISA**

For the Quantitative Determination of Osteocalcin in human serum and plasma

Pour la mesure quantitative de l'ostéocalcine dans le sérum ou le plasma humain

Zur quantitativen Bestimmung von Osteocalcin aus humanem Serum und Plasma

Kit per il dosaggio quantitativo dell'Osteocalcina nel siero e nel plasma umani

Para la determinación cuantitativa de osteocalcina en suero y plasma humano.



English.....	3
Français.....	13
Deutsch.....	19
Italiano.....	25
Español.....	31

IDS Ltd is not responsible for any other use of the kit or consequence hereof than the one specified above. Neither for misuse, e.g. use deviating from the procedure described in this manual. Furthermore, IDS Ltd is not to be made responsible for any diagnoses or conclusions made by the user or third party based on the results obtained with the kit nor for any consequences such interpretations may cause.

IDS Ltd dégage sa responsabilité de toute utilisation du kit autre que celle décrite dans le manuel et des conséquences pouvant en découler. De même pour toute adaptation du protocole tel que décrit dans ce manuel.

IDS Ltd ist nicht verantwortlich für ein missbräuchliche Verwendung des Kits, der abweicht von dem, worüber in diesem Handbuch geschrieben wurde. Desweiteren kann IDS Ltd nicht verantwortlich gemacht werden für eine Diagnose oder Schlussfolgerung, die von Benutzern oder Dritte basierend auf die Ergebnisse erhalten mit Kit gemacht wurden oder für jegliche Konsequenzen, die solche Interpretationen verursachen.

IDS Ltd non è responsabile per ogni uso diverso del kit, né per le eventuali conseguenze da ciò provocate, né per un uso errato del kit per non aver seguito correttamente le istruzioni contenute in questo manuale. Inoltre, IDS Ltd non può essere ritenuta responsabile per ogni diagnosi o conclusione fatta dall'utilizzatore o da altri, basata sui risultati ottenuti con il kit, né per le eventuali conseguenze che tale interpretazione possa provocare.

A IDS Ltd não se responsabilizará pela utilização inadequada do kit, isto é: utilização que difere do procedimento descrito neste manual. Desta forma, a IDS Ltd não pode ser responsabilizada por quaisquer diagnósticos ou conclusões realizadas pelo médico e/ou usuário do kit ou por quaisquer conseqüências que estas interpretações possam causar.

## INTRODUCTION

### Intended use

The N-MID® Osteocalcin ELISA is an enzyme immunological test for the quantitative measurement of osteocalcin, an indicator of osteoblastic activity in human serum and plasma and is **intended to be used as an aid in the prevention of osteoporosis**.

### Limitations

Osteocalcin values may vary depending upon the person's age (years post menopause), "circadian rhythm", rate of glomerular filtration and duration of treatment.

Results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation of the patient and other diagnostic procedures. Therefore, osteocalcin values are not recommended for use as a screening procedure to detect the presence of osteoporosis in the general population. Also, medication dosage should not be changed or stopped based solely on the osteocalcin values.

When evaluating subsequent samples, collect at the same time of day as baseline and use the same specimen type, serum or anticoagulated plasma.

### Summary and explanation of the test

Osteocalcin, or bone Gla protein (BGP), is the major non-collagenous protein of bone matrix. It has a molecular weight of approximately 5800 Dalton and consists of 49 amino acids, including three residues of gamma-carboxyglutamic acid.

Osteocalcin is synthesized in bone by osteoblasts. After production, it is partly incorporated into the bone matrix and partly delivered to the circulatory system. The precise physiological function of osteocalcin is still unclear. A large number of studies have shown that the circulating level of osteocalcin reflects the rate of bone formation (1-14).

Determination of serum osteocalcin has proved to be valuable as an aid in identifying women at risk of developing osteoporosis, for monitoring bone metabolism during the perimenopause and postmenopause and during antiresorptive therapy.

### Principle of the procedure

The N-MID® Osteocalcin ELISA is based upon the application of two highly specific monoclonal antibodies (Mabs) against human osteocalcin. An antibody recognizing the midregion (amino acids 20-29) is used as the capture antibody and for detection a peroxidase conjugated antibody recognizing the N-terminal region (amino acids 10-16) is used. In addition to intact osteocalcin (amino acid 1-49) the N-terminal-Mid fragment (amino acids 1-43) is also detected.

Standards, control and unknown samples are pipetted into the appropriate microtitre wells coated with streptavidin. Then a mixture of a biotinylated antibody and a peroxidase conjugated antibody is added. Following incubation for 2 hours at room temperature the wells are washed and a chromogenic substrate is added and the colour reaction is stopped with sulfuric acid. Finally, the absorbance is measured.

## PRECAUTIONS

The following precautions should be observed in the laboratory:

- Do not eat, drink, or smoke where immunodiagnostic materials are being handled
- Do not pipette by mouth
- Wear gloves when handling immunodiagnostic materials and wash hands thoroughly afterwards
- Cover working area with disposable absorbent paper

### Storage

Store the N-MID® Osteocalcin ELISA kit upon receipt at 2-8°C. Under these conditions the kit is stable up to the expiry date stated on the box.

Following reconstitution the **Standards** and the **Controls** should be stored below -18°C for up to 3 months, and should only be frozen and thawed twice. When the components of the **Antibody Solution** are mixed, the remaining solution should be stored at 2-8°C for no longer than 1 month or frozen below -18°C. The remaining reagents and immunostrips should be stored at 2-8°C.

### Warnings

For *in vitro* use only.

- All reagents and laboratory equipment should be handled and disposed of as if they were infectious.
- Do not use kit components beyond the expiry date and do not mix reagents from different lots.

## MATERIALS

### Specimen collection

Collect blood by venipuncture taking care to avoid haemolysis. Separate the serum from the cells within 3 hours after collection of blood. It is recommended to freeze (<-18°C) samples immediately. When analysing plasma, both heparin and EDTA plasma may be used.

### Materials supplied

Before opening the kit, read the section on **Precautions**. The kit contains reagents sufficient for 96 determinations. For reconstitution of lyophilized material, add appropriate volume of distilled water and leave for 10 minutes before mixing. Make sure to avoid foam.

### **Streptavidin coated microtitre plate** **MICROPLAT**

Microwell strips (12 x 8 wells) pre coated with streptavidin. Supplied in a plastic frame.

### **Osteocalcin Standard 0** **CAL 0**

One vial (lyophilized) containing a PBS-buffered solution with protein stabilizer and preservative. Reconstitute with 5.0 mL of distilled water. The standard must be stored below -18°C after use.

### **Osteocalcin Standards** **CAL 1-5**

Five vials (lyophilized) containing synthetic human osteocalcin in a PBS-buffered solution with protein stabilizer and preservative. Reconstitute with 0.5 mL of distilled water. The exact value of each Standard is printed on the QC Report. The standards must be stored below -18°C after use, and should only be frozen and thawed twice.

### **Controls** **CTRL 1-2**

Two vials (lyophilized) containing synthetic human osteocalcin in a PBS-buffered solution with protein stabilizer and preservative. Reconstitute with 0.5 mL of distilled water. Controls must be stored below -18°C, and should only be frozen and thawed twice. Please refer to enclosed QC Report for control range.

### **Peroxidase Conjugated Antibody** **ENZYMCONJ**

One vial (min. 0.25 mL) of a concentrated solution of a peroxidase conjugated murine monoclonal antibody specific against the N-terminal region of osteocalcin in a TRIS-buffered solution with protein stabilizer, detergent and preservative. Prior to use, add 10 mL **Conjugate Diluent Solution**.

### **Biotinylated Antibody** **Ab BIOTIN**

One vial (min. 0.25 mL) of a concentrated conjugate solution of biotinylated murine monoclonal antibody against the mid-region of osteocalcin in a TRIS-buffered solution with protein stabilizer, detergent and preservative. Prior to use, add 10 mL **Conjugate Diluent Solution**.

### **Conjugate Diluent Solution** **BUF**

One vial (min. 22 mL) of a PBS-buffered solution with protein stabilizer, detergent and preservative.

### **Substrate Solution** **SUBS TMB**

One vial (min. 12 mL) of a ready for use tetramethylbenzidine (TMB) substrate in an acidic buffer. Please note that the chromogenic substrate might appear slightly bluish.

### **Stopping Solution** **H2SO4**

One vial (min. 12 mL) of ready for use 0.18 mol/L sulfuric acid.

### **Washing Solution** **WASHBUF 50x**

One vial (min. 20 mL) of a concentrated washing buffer with detergent and preservative. Dilute 1+50 times in distilled water before use.

### **Sealing tape**

Adhesive film for covering wells during incubation.

### Materials required — not supplied

- Containers for preparing the Antibody Solution and the Washing Solution.
- Precision micropipettes to deliver 20 µL
- Distilled water
- Precision 8- or 12-channel multipipette to deliver 100 µL and 150 µL.
- Microtiter plate reader with both 450 nm and 650 nm filters

## ASSAY PROCEDURE

For optimal performance of the assay it is important to comply with the instructions given below

### Assay Procedure

Prior to use, prepare and equilibrate all solutions to room temperature. **Perform the assay at 18-22°C.**

Determine the number of strips needed for the assay. It is recommended to test all samples in duplicate. In addition, for each run a total of 16 wells are needed for the standards and controls. Place the appropriate number of strips in the plastic frame. Store unused immunostrips in the tightly closed foil bag with desiccant capsules.

#### 1 Preparation of the Antibody Solution:

The **Antibody Solution** is prepared by 1) adding 10 mL of **Conjugate Diluent Solution** (BUF) to both the **Peroxidase Conjugated Antibody Solution** (ENZYMCONJ) and the **Biotinylated Antibody Solution** (Ab BIOTIN), and 2) mixing the two conjugate solutions in equal volumes.

#### 2 Incubation in Immuno Strips

Pipette 20 µL of either **Standards** (CAL 0-5), **Controls** (CTRL 1-2), or unknown samples into appropriate wells followed by 150 µL of the **Antibody Solution**. Cover the immunostrips with sealing tape and incubate for 120±5 minutes at 18-22°C (without any mixing).

#### 3 Washing

Wash the immunostrips 5 times manually with 300 µL diluted **Washing Buffer** (WASHBUF 50x diluted 1+50 in distilled water). Using an automated plate washer, follow the instructions of the manufacturer or the guidelines of the laboratory. Usually 5 washing cycles are adequate. Make sure that the wells are **completely emptied** after each manual or automatic washing cycle.

#### 4 Incubation with chromogenic substrate solution

Pipette 100 µL of the **Substrate Solution** (SUBS TMB) into each well and incubate for 15±2 minutes at 18-22°C in the dark (without any mixing). Use sealing tape. Do not pipette directly from the vial containing TMB substrate but transfer the needed volume to a clean reservoir. Remaining substrate in the reservoir should be discarded and not returned to vial TMB.

#### 5 Stopping of colour reaction

Pipette 100 µL of the **Stopping Solution** (H2S04) into each well.

#### 6 Measurement of absorbance

Measure the absorbance at 450 nm with 650 nm as reference within two hours.

### Limitations of the procedure

If the absorbance of a sample exceeds that of **Standard 5**, the sample should be diluted in **Standard 0** and re-analysed.

## QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

## RESULTS

### Calculation of results

A four-parametric logistic curve fit can be used.

Alternatively, calculate the mean of the duplicate absorbance determinations. Construct a standard curve on graph paper by plotting the mean absorbances of the six standards (ordinate) against the corresponding osteocalcin concentrations (abscissa). Determine the osteocalcin concentration of the controls and each patient sample by interpolation.

### Example of results obtained:

Standards/ Controls/ Samples	Osteocalcin (ng/mL)	A <sub>450nm-650nm</sub> Obs 1/ Obs 2	Mean A <sub>450nm-650nm</sub>	Interpolated Osteocalcin (ng/mL)
Standard 0	0.0	0.019 / 0.020	0.020	
Standard 1	4.2	0.108 / 0.096	0.102	
Standard 2	7.6	0.183 / 0.177	0.180	
Standard 3	19.4	0.627 / 0.656	0.642	
Standard 4	35.4	1.271 / 1.278	1.275	
Standard 5	56.1	1.988 / 1.873	1.931	
Control 1		0.474 / 0.459	0.467	15.1
Control 2		1.147 / 1.132	1.140	31.8
Sample I		0.099 / 0.105	0.102	4.6
Sample II		0.899 / 0.850	0.875	25.1
Sample III		1.412 / 1.375	1.394	38.7

**Please note:** The data above are for illustration only and should not be used to calculate the results of another assay.

### Performance characteristics

All performance data have been established using second morning void urine samples unless otherwise indicated.

**Detection limit:** 0.5 ng/mL Osteocalcin

This is the concentration corresponding to three standard deviations above the mean of 21 determinations of the blank ("Osteocalcin Standard 0").

### Precision

The precision of the N-MID® Osteocalcin ELISA was evaluated for three serum samples. The results are summarised in the table below:

#### InterAssay Variation (n=10)

Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

#### IntraAssay Variation (n=10)

Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

### Dilution/Linearity

It was investigated if the N-MID® Osteocalcin ELISA assay was sensitive to any effect of the serum matrix. Four serum samples were diluted in Standard 0, and the concentrations were determined in the N-MID® Osteocalcin ELISA.

Sample	Dilution	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (% of expected value)
1	1 / 1	12.0	12.0	100
	1 / 2	5.1	6.0	84
	1 / 4	2.7	3.0	88
	1 / 8			
2	1 / 1	36.1	36.1	100
	1 / 2	18.1	18.1	106
	1 / 4	9.0	9.0	105
	1 / 8	4.7	4.5	104
3	1 / 1	38.2	38.2	100
	1 / 2	20.5	19.1	107
	1 / 4	9.9	9.6	104
	1 / 8	4.3	4.8	90
4	1 / 1	48.1	48.1	100
	1 / 2	23.8	24.1	99
	1 / 4	12.2	12.0	101
	1 / 8	6.3	6.0	105

### Recovery

The accuracy of the N-MID® Osteocalcin ELISA was determined by spiking human serum with different amounts of synthetic osteocalcin. Three serum samples were mixed in equal volumes with 4 standard solutions and assayed in the N-MID® Osteocalcin ELISA.

Sample	Standards synthetic osteocalcin (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (% of expected value)
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92
	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

### Measuring Range

The measuring range for N-MID® Osteocalcin ELISA is between 0.5 ng/mL and 100 ng/mL osteocalcin.

### Interference:

In the concentration listed below no interference was detected:

Lipid (IntraLipid): 15 g/L  
Bilirubin: 200 mg/L  
Hemoglobin: 5 g/L

## Expected values

It is advisable for a laboratory to establish its own range of normal and pathological values. As an example, the mean values and standard deviations for various populations are given below. For further reading, please refer to the reference list.

Populations	Number of subjects	Mean Values (ng/mL)	95% Confidence Interval
Premenopausal women	77	17.4	8.4 – 33.9
Postmenopausal women <sup>1)</sup>	131	26.5	12.8 – 55.0
Males	85	19.8	9.6 – 40.8

<sup>1)</sup> The average years after menopause is 10.3 years.

## Day to Day Intra-individual Variation

The Day to Day Intra-individual Variation was assessed by analyzing serum samples (morning fasting) from 11 healthy postmenopausal women at five time points over 2 weeks.

Subject	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4

## CLINICAL DATA

The N-MID<sup>®</sup> Osteocalcin ELISA has been used to monitor treatment in several clinical studies and the osteocalcin values have been compared to Bone Mineral Density (BMD<sub>spine</sub>) measurements.

All the clinical studies presented below were performed according to the European Standard for good clinical practice (GCP and GLP).

The clinical studies presented here were conducted on white Danish women. However, several studies have been published showing that other demographic groups display similar osteocalcin decrease in response to anti-resorptive therapies (7, 8, 11, 12, 14).

The Bone Mineral Density (BMD) was measured at the Lumbar spine (L1 – L4). The change in the bone mineral density presented below is  $\alpha$ -BMD, which is defined as the slope of the linear regression line for BMD<sub>spine</sub> versus time (years) for the period of treatment, i.e.  $\alpha$ -BMD represents the % change in BMD<sub>spine</sub> per year.

### HRT study:

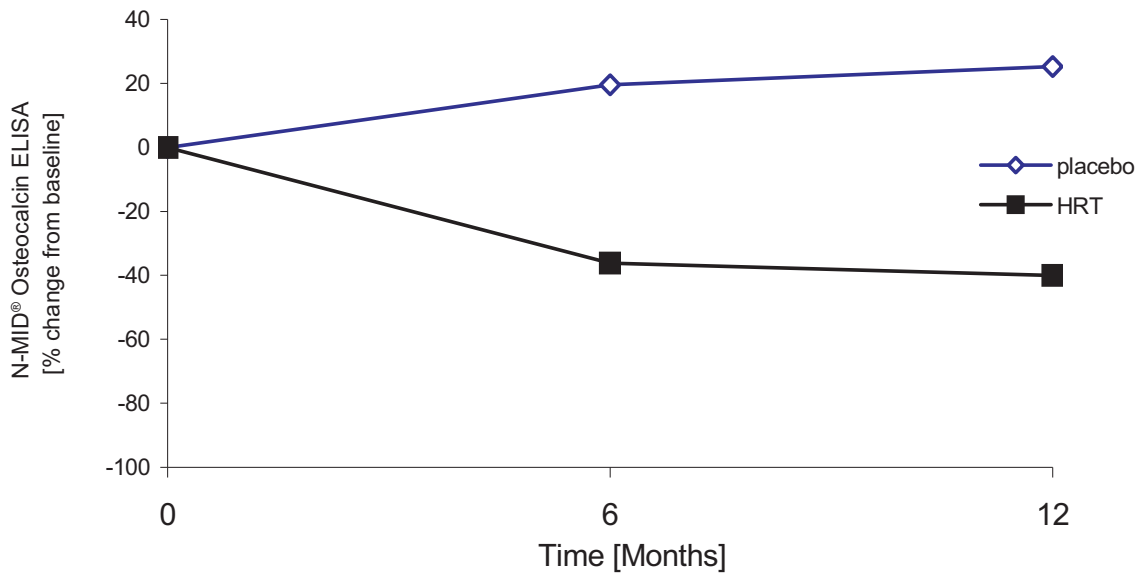
- Women more than 45 year and 1-6 years since menopause
- 35 participants on placebo
- 26 participants on active treatment

### Bisphosphonate study:

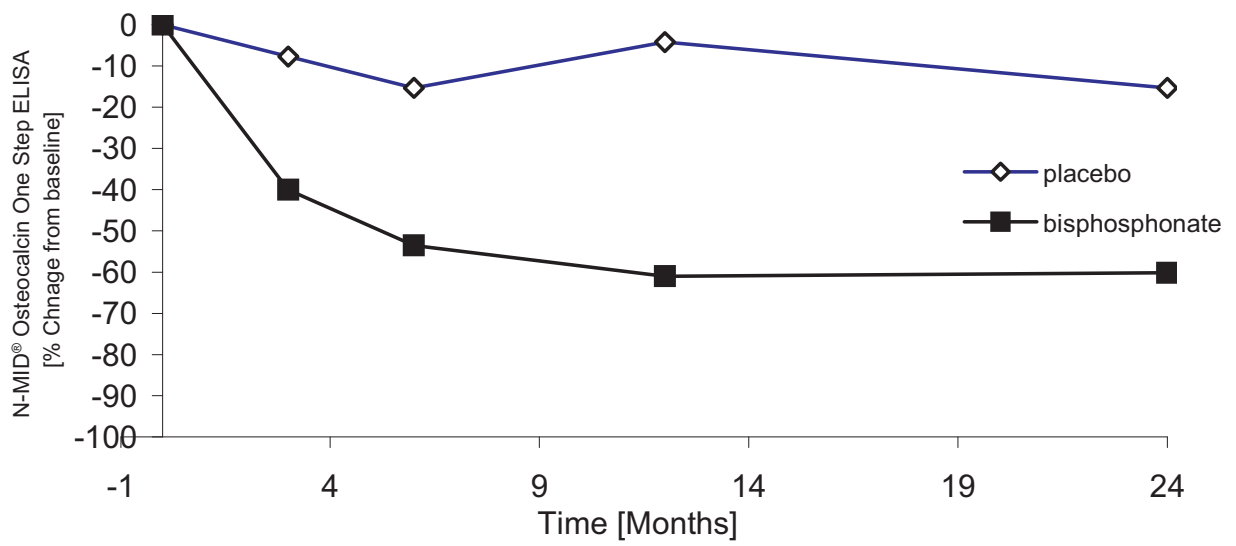
- Women between age 40 and 59 years, and 6 months to 3 years since menopause.
- 12 participants on placebo
- 31 participants on active treatment



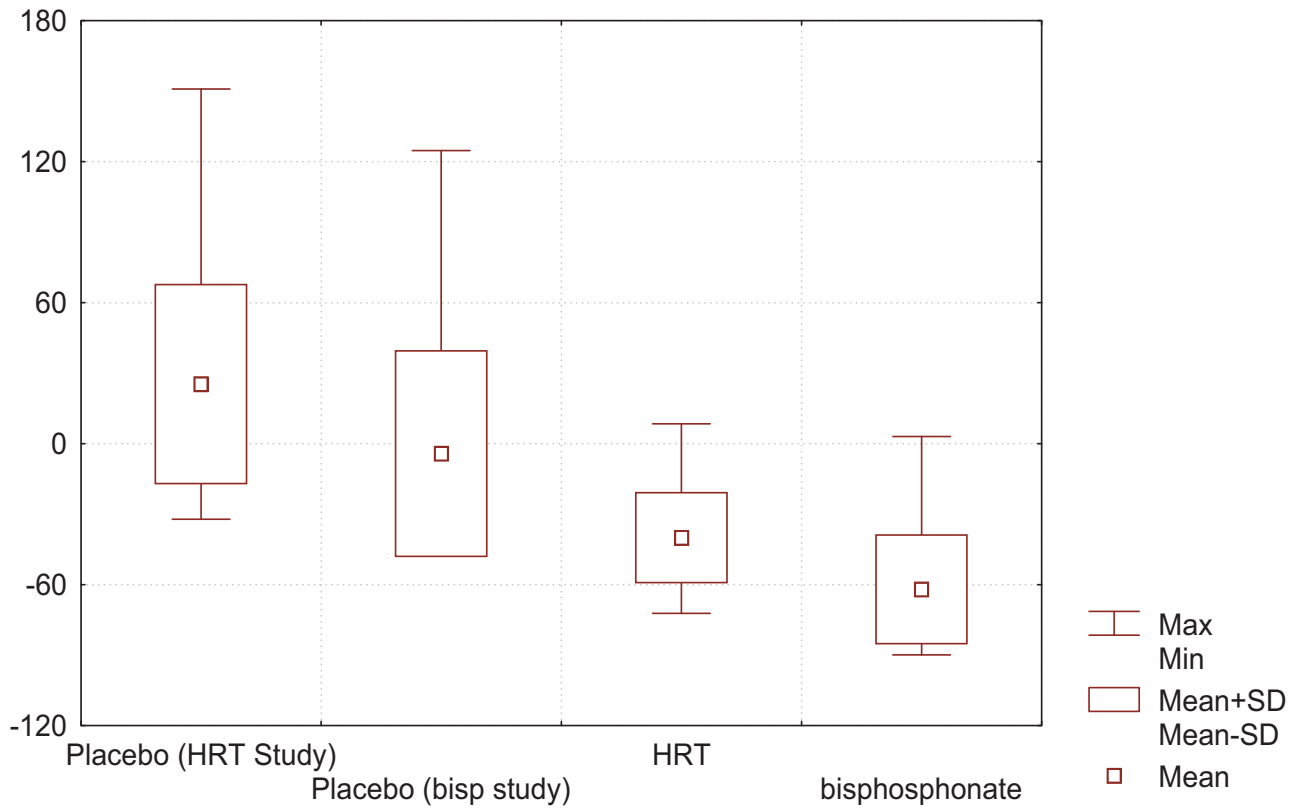
**N-MID® Osteocalcin ELISA  
(% Change from Baseline)  
Response to HRT**



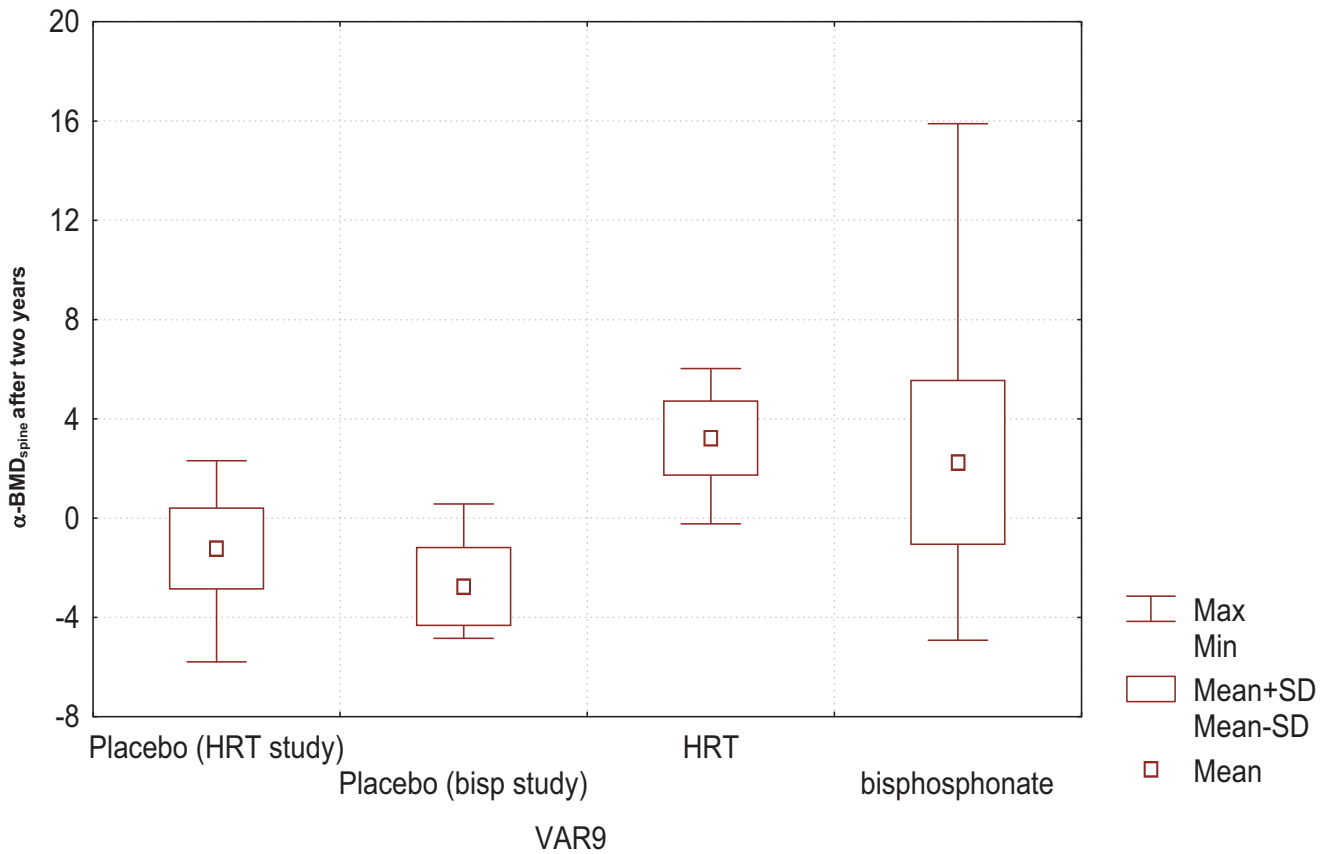
**N-MID® Osteocalcin ELISA  
(% Change from Baseline)  
Response to Bisphosphonate therapy**



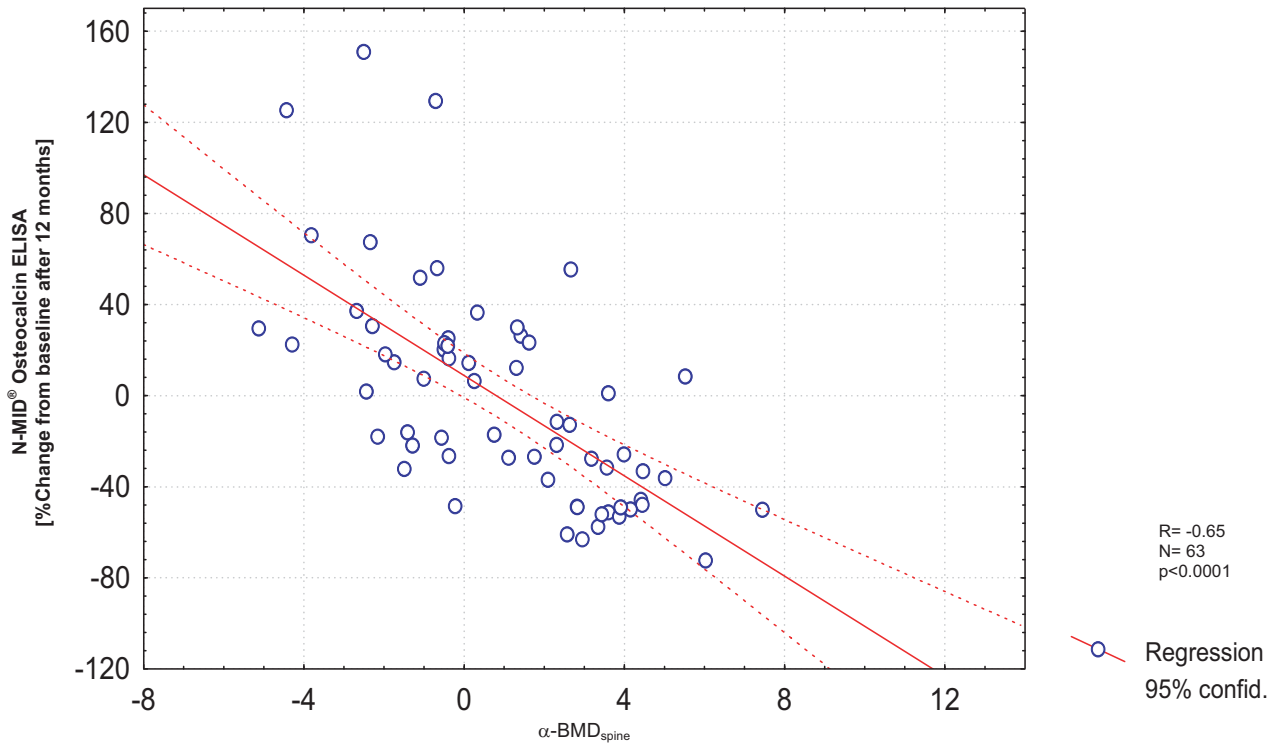
**Response of N-MID<sup>®</sup> Osteocalcin ELISA to HRT or Bisphosphonate Treatment**



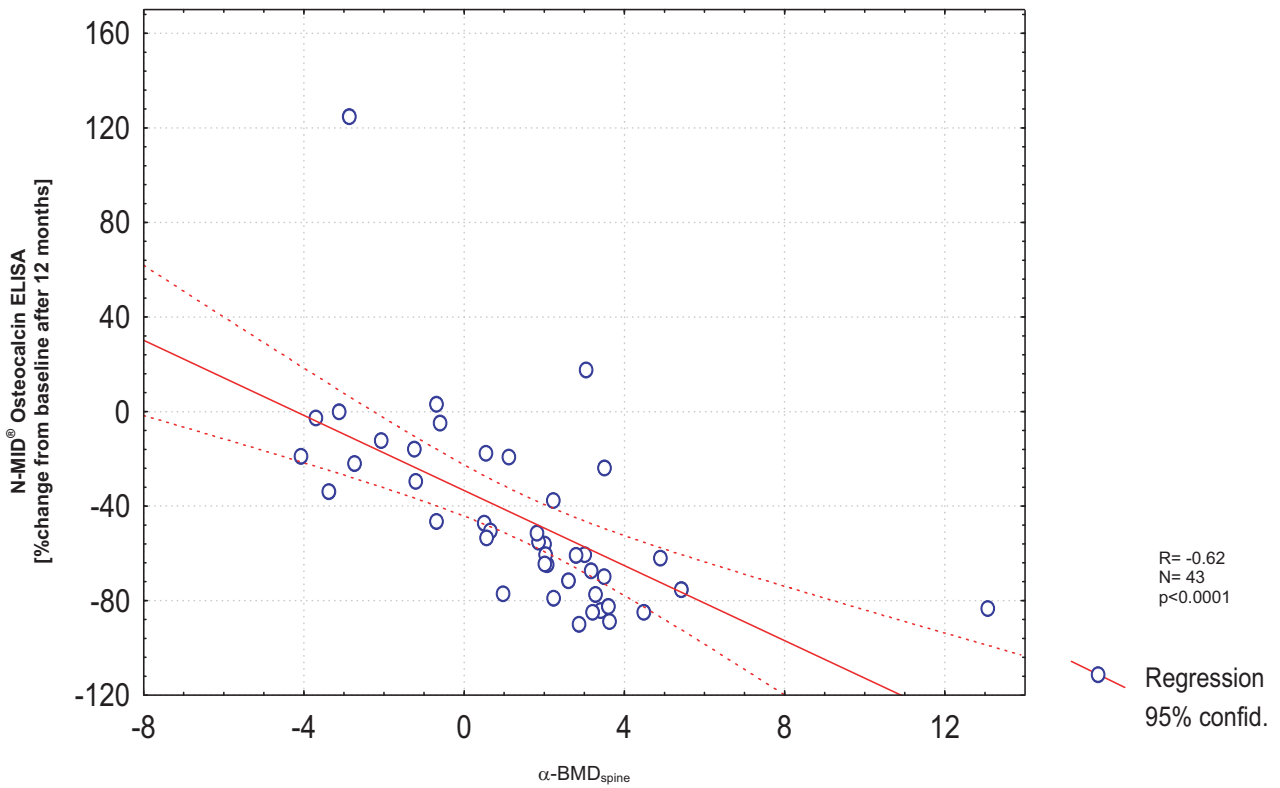
**Response of BMD<sub>spine</sub> to HRT or Bisphosphonate Treatment**



### Correlation between $\alpha$ -BMD<sub>spine</sub> and N-MID<sup>®</sup> Osteocalcin ELISA - HRT study



### Correlation between $\alpha$ -BMD<sub>spine</sub> and N-MID<sup>®</sup> Osteocalcin ELISA - Bisphosphonate study



Below is summarized the specificity and sensitivity using different cut-off values of N-MID® Osteocalcin ELISA, change from baseline after 12 months HRT or Bisphosphonate treatment for  $\alpha$ -BMD cut-off of 0.5%.

95% confidence intervals are indicated.

#### HRT study

Cut-off of change in osteocalcin	Specificity	Sensitivity
-10 [% change from baseline]	83 (64 – 94)	74 (55 – 87)
-20 [% change from baseline]	76 (56 – 90)	85 (69 – 95)
-30 [% change from baseline]	62 (42 – 79)	94 (80 – 99)
-40 [% change from baseline]	48 (29 – 67)	97 (85 – 100)

#### Bisphosphonate study

Cut-off of change in osteocalcin	Specificity	Sensitivity
-10 [% change from baseline]	100 (89 – 100)	35 (14 – 62)
-20 [% change from baseline]	96 (80 – 100)	59 (33 – 82)
-30 [% change from baseline]	96 (80 – 100)	76 (50 – 93)
-40 [% change from baseline]	92 (75 – 99)	82 (57 – 96)

## INTRODUCTION

### But du dosage

Le kit N-MID® Osteocalcin ELISA est une trousse pour le dosage quantitatif de l'ostéocalcine, un indicateur de l'activité ostéoblastique, dans le sérum ou le plasma humain.

### Limitations

Les taux d'ostéocalcine peuvent varier en fonction de l'âge (temps après la ménopause), des rythmes circadiens, du niveau de filtration glomérulaire et durant les traitements.

Les résultats doivent toujours être interprétés en regard des informations provenant de l'examen clinique du patient et d'autres paramètres diagnostiques. En conséquence, il n'est pas recommandé d'utiliser les valeurs mesurées d'ostéocalcine pour diagnostiquer l'ostéoporose dans les populations étudiées. De même, les traitements ne doivent pas être modifiés ou stoppés d'après la seule mesure d'ostéocalcine. Pour les suivis de patients, prélever les échantillons à la même heure que pour la première mesure et utiliser le même type de prélèvement, sérum ou plasma.

### Résumé

L'ostéocalcine ou « Bone Gla Protein » (BGP) est, après le collagène, la protéine principale de la matrice de l'os. Elle a un poids moléculaire voisin de 5800 Da et est constituée de 49 acides aminés dont 3 résidus de l'acide gamma-carboxyglutamique.

L'ostéocalcine est synthétisée dans l'os par les ostéoblastes. Elle est en partie incorporée dans la matrice de l'os et en partie libérée dans le système circulatoire. La fonction physiologique précise de l'ostéocalcine est encore mal connue. Un grand nombre d'études montre que le niveau de la concentration d'ostéocalcine circulante est le reflet du niveau de la synthèse osseuse.

Il a été démontré que le dosage de l'ostéocalcine est utile pour identifier les femmes présentant un risque d'ostéoporose, pour étudier le métabolisme de l'os pendant, après la ménopause et durant les traitements anti-résorptifs.

### Principe du dosage

L'ELISA N-MID® Osteocalcin est basé sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux hautement spécifiques de l'ostéocalcine humaine. Un anticorps reconnaissant la région médiane (séquence des acides aminés 20-29) est utilisé pour la capture ; Le second anticorps, conjugué à la peroxydase, reconnaît la région N terminale (aa 10-16). L'ostéocalcine native (aa 1-49) ainsi que le fragment N-Terminal-MID® (aa 1-43) sont également reconnus. Standards, contrôles et échantillons sont déposés dans les micropuits sensibilisés avec la streptavidine. Un mélange d'anticorps biotinylé et d'anticorps conjugué à la peroxydase est ajouté. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, les micropuits sont lavés et une solution de substrat chromogène est ensuite ajoutée. La réaction est arrêtée au bout de 15 minutes avec de l'acide sulfurique et l'absorbance mesurée.

## PRECAUTIONS

Les précautions suivantes doivent être observées dans le laboratoire :

- Ne pas fumer, boire ou manger ou utiliser de produit cosmétique dans les locaux où l'on manipule les échantillons ou les réactifs.
- Ne pas effectuer les pipetages à la bouche.
- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs ou des échantillons et se laver soigneusement les mains après.
- Couvrir l'espace de travail avec du papier absorbant jetable.

### Conditions de conservation

A réception, le kit N-MID® Osteocalcin ELISA doit être conservés à 2-8°C. Dans ces conditions, le kit est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Après reconstitution les standards et contrôles doivent être conservés à - 18°C jusqu'à 3 mois et peuvent seulement être congelés et décongelés 2 fois. Quand les composants de la solution d'anticorps sont mélangés, le volume non utilisé peut être conservé à 2-8°C pendant 1 mois maximum ou congelé à - 18°C. Les autres réactifs doivent être conservés à 2-8°C

## Avertissements

Produit uniquement à usage de diagnostique *in vitro*.

Tous les réactifs et équipements de laboratoire doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux.

Ne pas utiliser le kit au-delà de la date de péremption ; ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.

## MATERIEL

### Collecte des échantillons

BPrélever le sang en évitant l'hémolyse. Séparer le sérum de la fraction cellulaire au maximum 3 heures après prélèvement.

Il est recommandé de congeler immédiatement les échantillons (< -18°C). Le dosage peut être pratiqué sur plasma hépariné et EDTA.

### Composition de la trousse.

Avant d'ouvrir le kit, lire le chapitre précautions. Chaque trousse contient les quantités nécessaires pour 96 tests. Pour la reconstitution des réactifs lyophilisés, ajouter le volume requis d'eau distillée et laisser reposer 10 minutes avant de mélanger. Éviter la formation de mousse.

### Barrettes de micropuits **MICROPLAT**

96 micropuits fractionnables par barrette de 12 X 8, sensibilisés avec la streptavidine. Ils sont fournis dans un sachet plastique.

### Standard ostéocalcine 0 **CAL 0**

Un flacon (solution lyophilisée). Il contient une solution tampon PBS, des protéines animales et un conservateur. Reconstituer avec 5.0 mL d'eau distillée. Le standard doit être conservé à -18°C après la première utilisation.

### Standards ostéocalcine **CAL 1-5**

5 flacons (solutions lyophilisées). Elles contiennent de l'ostéocalcine humaine synthétique, une solution tampon, des protéines animales et un conservateur. La valeur exacte de chaque standard est imprimée sur le rapport du contrôle de qualité. Reconstituer avec 0.5 mL d'eau distillée. Les standards doivent être conservés à -18°C après la première utilisation. Ils peuvent être décongelés deux fois

### Contrôle **CTRL 1-2**

2 flacon (solution lyophilisée) contenant de l'ostéocalcine humaine synthétique, une solution tampon PBS, des protéines animales, un détergent et un conservateur. Reconstituer avec 0.5 mL d'eau distillée. Le contrôle doit être conservé à -18°C après la première utilisation. Il peut être décongelé deux fois. Se référer au document joint au kit pour les valeurs cibles.

### Anticorps conjugué à la peroxydase **ENZYMCONJ**

1 flacon (min. 0.25 mL) de solution concentrée contenant un anticorps monoclonal dirigé contre la partie N-terminale de l'ostéocalcine, conjugué à la peroxydase, du tampon TBS, du détergent et un conservateur. Avant utilisation ajouter 10 mL de la solution de dilution du conjugué.

### Anticorps biotinylé **Ab BIOTIN**

1 flacon (min. 0.25 mL) de solution concentrée contenant un anticorps monoclonal biotinylé dirigé contre la partie médiane de l'ostéocalcine un tampon TBS, du détergent et un conservateur. Avant utilisation ajouter 10 mL de la solution de dilution du conjugué.

### Solution diluante du conjugué **BUF**

1 flacon (min. 22 mL) de solution prête à l'emploi. Il contient une solution de tampon PBS, des protéines animales, du détergent et un conservateur.

### Solution substrat **SUBS TMB**

1 flacon (min. 2 mL de solution prête à l'emploi). Il contient de l'eau oxygénée et du substrat tétraméthylbenzidine (TMB) dans une solution acide. La solution de substrat peut sembler légèrement

bleue.

**Solution d'arrêt** **H2S04**

1 flacon (min. 12 mL) de solution prête à l'emploi. Il contient de l'acide sulfurique 0.18 mol/l.

**Solution de lavage** **WASHBUF 50x**

1 flacon (min. 20 mL) de solution tampon concentrée. Il contient un détergent et un conservateur.

**Film adhésif**

Film adhésif pour couvrir les micropuits pendant les incubations.

**Matériel et produits nécessaires mais non fournis**

- Récipients pour la préparation des solutions d'anticorps et de lavage.
- Micropipettes de précision permettant la distribution de 20 µL, 100 µL et 150 µL.
- Eau distillée.
- Multipipettes de précision à 8 ou 12 canaux permettent la distribution de 100 µL et 150 µL.
- Lecteur de plaque avec des filtres à 450 nm et 650 nm.

## PROTOCOLE DU DOSAGE

**Pour des performances optimales, il est important de se conformer aux instructions suivantes.**

### Procédure

Déterminer le nombre de barrettes nécessaire pour le dosage. Il est conseillé d'effectuer les mesures en double pour les standards, les contrôles et les échantillons. Il est donc nécessaire d'utiliser 16 micropuits pour les standards et contrôle lors de chaque dosage. Conserver les barrettes de micropuits non utilisées dans les sachets fermés en présence des déshydratants.

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18-22°C) avant leur utilisation. La distribution des réactifs et les incubations s'effectuent également à température ambiante.

### 1 Préparation de la solution d'anticorps

La solution d'anticorps est préparée en ajoutant min. 10 mL de solution diluante **BUF** à la fois dans la solution d'anticorps conjugué à la peroxydase **ENZYMCONJ** et à la solution d'anticorps biotinylés **Ab BIOTIN**. Mélanger les deux solutions obtenues volume à volume ce qui constitue la solution d'anticorps.

### 2 Incubation dans les puits

Distribuer 20 µL de standards **CAL 0-5**, de contrôle **CTRL 1-2** ou d'échantillons dans les micropuits correspondants. Ajouter 150 µL de solution d'anticorps. Recouvrir les micropuits avec le film adhésif et incubé 120±5 minutes à 18-22°C (sans agitation).

### 3 Lavage

Laver les barrettes 5 fois manuellement avec 300 µL la solution de lavage (**WASHBUF 50x** diluée à 1+50 dans l'eau distillée). Dans le cas d'un lavage avec un laveur automatique de plaques suivre les instructions du fabricant ou le guide du laboratoire. S'assurer que les puits soient complètement vides après chaque série de lavage.

### 4 Incubation avec la solution substrat

Déposer 100 µL de la solution substrat **SUBS TMB** dans chaque puits, recouvrir les micropuits avec un film adhésif et incubé 15±2 minutes à 18-22°C, à l'abri de la lumière (sans agitation). Ne pas prélever la solution substrat directement dans le flacon mais transférer le volume nécessaire dans un tube propre. Le substrat transféré et non utilisé sera jeté et ne doit pas être rajouté au flacon TMB.

### 5 Arrêt de la réaction colorée

Distribuer 100 µL de solution d'arrêt **H2S04** dans chaque puits.

### 6 Mesure de l'absorbance

Dans les 2 heures, mesurer l'absorbance à 450 nm et 650 nm en utilisant un lecteur de plaque.

### Limitations de mesure

Si les absorbances des échantillons dépassent celle du standard 5 ; les échantillons doivent être dilués dans le standard 0 et re-testé.

## CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosages pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

## RESULTATS

### Calcul des résultats

Un ajustement 4-parametre (équation du second degré) peut être utilisé pour l'ajustement de la courbe. Sinon calculer la moyenne des absorbances des doublets. Puis calculer la moyenne corrigée en soustrayant l'absorbance moyenne du standard 0 (Blanc). Construire une courbe d'étalonnage, en reportant la moyenne des absorbances des six standards en ordonnée et les concentrations respectives d'ostéocalcine en abscisse. Tracer la courbe. Lire la concentration en ostéocalcine pour le contrôle et les échantillons par interpolation de la courbe.

### Exemple de résultats :

Standards/ Contrôles/ Échantillons	Ostéocalcine (ng/mL)	A <sub>450-650</sub> (OD) Obs 1/ Obs 2	Moyenne A <sub>450-650</sub> (OD)	Concentration (ng/mL)
Standard 0	0.0	0.019 / 0.020	0.020	
Standard 1	4.2	0.108 / 0.096	0.102	
Standard 2	7.6	0.183 / 0.177	0.180	
Standard 3	19.4	0.627 / 0.656	0.642	
Standard 4	35.4	1.271 / 1.278	1.275	
Standard 5	56.1	1.988 / 1.873	1.931	
Control 1		0.474 / 0.459	0.467	15.1
Control 2		1.147 / 1.132	1.140	31.8
Sample I		0.099 / 0.105	0.102	4.6
Sample II		0.899 / 0.850	0.875	25.1
Sample III		1.412 / 1.375	1.394	38.7

**Note : ces données sont utilisées à titre d'exemple et ne doivent en aucun cas être substituées aux résultats obtenus dans le laboratoire.**

### Performances du dosage

*Limite de détection :* 0.5 ng/mL

Cette valeur correspond à 3 fois la déviation standard de la moyenne de 21 déterminations du blanc (« Ostéocalcine standard 0 »).

### *Imprécision*

Elle a été évaluée à l'aide de 3 échantillons de sérum de concentrations différentes. La variation inter-essai a été évaluée en analysant 3 échantillons dans 10 séries successives. La variation intra-essai en analysant 3 échantillons dans 10 séries successives. Les résultats sont résumés ici :



## Variation inter-essai (n=10)

Moyenne	Déviati on standard (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

## Variation intra-essai (n=10)

Moyenne	Déviati on standard (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

*Dilution / Linéarité*

La gamme de mesure du kit ELISA N-MID® Ostéocalcine va de 0.5 ng/mL à 100 ng/mL.

L'effet matrice a été testé dans le kit. Quatre échantillons de sérum ont été dilués dans du standard 0 et dosés par le kit. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Echantillons	Dilution	Valeur mesurée (ng/mL)	Valeur attendue (ng/mL)	Récupération [% de valeur attendue]
1	1 / 1	12.0	12.0	100
	1 / 2	5.1	6.0	84
	1 / 4	2.7	3.0	88
	1 / 8			
2	1 / 1	36.1	36.1	100
	1 / 2	18.1	18.1	106
	1 / 4	9.0	9.0	105
	1 / 8	4.7	4.5	104
3	1 / 1	38.2	38.2	100
	1 / 2	20.5	19.1	107
	1 / 4	9.9	9.6	104
	1 / 8	4.3	4.8	90
4	1 / 1	48.1	48.1	100
	1 / 2	23.8	24.1	99
	1 / 4	12.2	12.0	101
	1 / 8	6.3	6.0	105

*Récupération*

La précision du kit ELISA N-MID® Ostéocalcine a été évaluée en supplémentant des sérums humains avec différentes doses d'ostéocalcine synthétique. Trois échantillons de sérum ont été mélangés à volume égal avec 4 solutions d'ostéocalcine puis dosés dans le kit.

Echantillons	Quantité ajoutée osteocalcine (ng/mL)	Valeur mesurée (ng/mL)	Valeur attendue (ng/mL)	Récupération [% de valeur attendue]
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92
	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

### Interférence

Différentes interférences ont été testées dans le kit ELISA N-MID® Ostéocalcine.

Aux concentrations suivantes, aucune interférence n'a été constatée :

Lipide :	15 g/L
Bilirubine :	200 mg/L
Hémoglobine :	5 g/L

### Valeurs attendues

Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme de valeurs normales et pathologiques. A titre d'exemple, les valeurs moyennes et déviations standards sont indiquées pour différentes populations.

Populations	Nombre de sujets	Valeur moyenne (ng/mL)	95% Confidence Interval
Femmes pré-ménopause	77	17.4	8.4 – 33.9
Femmes post-ménopause <sup>1)</sup>	131	26.5	12.8 – 55.0
Hommes	85	19.8	9.6 – 40.8

<sup>1)</sup> l'âge moyen post-ménopause est de 10.3 ans.

### Variations individuelles journalières

Les Variations individuelles journalières ont été évaluées en analysant les sérums (prélevés le matin à jeun) de 11 femmes ménopausées prélevées 5 fois sur une période de 2 semaines.

Sujet	Moyenne (ng/mL)	Déviations standard (ng/mL)	CV (%)
1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4

## **EINLEITUNG**

### **Verwendungszweck**

Der N-MID® Osteocalcin ELISA ist ein enzymimmunologischer Test für die quantitative Bestimmung von Osteocalcin, einem Indikator der Osteoblasten Aktivität in humanem Serum und Plasma und wird vorgesehen zur Verwendung als eine Hilfe in der Osteoporoseprävention.

### **Einschränkungen**

Die Osteocalcinwerte können abhängig vom Alter (Jahre postmenopausal), „zirkadianen Rhythmus“, Rate der glomerulären Filtration und dem Behandlungszeitraum der Personen variieren. Die Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit verfügbaren klinischen Informationen des Patienten oder andere diagnostischen Verfahren gedeutet werden. Deshalb wird es nicht empfohlen Osteocalcinwerte zum Screenen einzusetzen, um das Vorhandensein von Osteoporose festzustellen. Desweiteren sollte die Dosierung der Medikamente nicht verändert oder beendet werden ausschliesslich basierend auf Osteocalcinwerte.

Wenn nachfolgende Proben gemessen werden, sollten diese zum gleichen Zeitpunkt am Tag und in der gleichen Probenart, Serum oder antikoaguliertes Plasma, gewonnen werden.

### **Zusammenfassung und Erklärung des Tests**

Osteocalcin oder „bone Gla Protein“ (BGP) ist das hauptsächlich nicht-kollagene Protein der Knochenmatrix. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 5800 Dalton und besteht aus 49 Aminosäuren, einschließlich 3 Resten der Gamma-Carboxyglutaminsäure.

Osteocalcin wird in den Knochen von Osteoblasten synthetisiert. Nach der Bildung wird es teilweise in die Knochenmatrix eingebaut und teilweise in die Blutbahn freigesetzt. Die genaue physiologische Funktion des Osteocalcin ist noch unklar. In zahlreiche Studien wurde gezeigt, dass die zirkulierende Menge von Osteocalcin die Rate der Knochenbildung widerspiegelt (1-14).

Die Bestimmung des Osteocalcin im Serum hat sich als wertvoll erwiesen für die Identifizierung von Frauen mit erhöhtem Osteoporoserisiko, für das Monitoring des Knochenstoffwechsels während Perimenopause und Postmenopause und während einer antiresorptiven Therapie.

### **Testprinzip**

Der N-MID® Osteocalcin ELISA basiert auf der Verwendung von zwei hoch spezifischen monoklonalen Antikörpern (Mabs) gegen humanes Osteocalcin. Ein Antikörper, der die mittlere Region (Aminosäure 20-43) erkennt, wird als Fänger-Antikörper benutzt. Dem Nachweis dient ein Peroxidase-konjugierter Antikörper, der spezifisch für die N-terminale Region (Aminosäure 10-16) ist. Zusätzlich, zum intakten Osteocalcin (Aminosäure 1-49) wird auch das N-terminale Midfragment (Aminosäure 1-43) bestimmt. Standards, Kontrollen oder unbekannte Proben werden in die vorbereiteten Wells der Mikrotiterstrips pipettiert, die mit Streptavidin beschichtet sind. Dann wird ein Gemisch von biotinyliertem Antikörper und Peroxidase-konjugiertem Antikörper zugefügt. Nach einer Inkubation über 2 Stunden bei Raumtemperatur werden die Wells gewaschen und ein chromogenes Substrat (TMB) zugegeben. Die Farbreaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt und die Absorption gemessen.

## **VORSICHTSMASSNAHMEN**

Folgende Vorsichtsmassnahmen sollten im Labor eingehalten werden:

- Beim Gebrauch von immunodiagnostischen Materialien sollte nicht gegessen, getrunken, geraucht oder Kosmetik benutzt werden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Verwendung immundiagnostischer Materialien sollten Handschuhe getragen werden. Hände anschliessend gründlich waschen.
- Die Arbeitsfläche sollte mit absorbierendem Papier abgedeckt werden.

### **Aufbewahrung**

Der N-MID® Osteocalcin ELISA kit nach Erhalt bei 2-8°C aufbewahrt werden. Unter diesen Bedingungen ist der kit stabil bis zum Verfallsdatum wie an der Packung angegeben.

Nach dem Auflösen sollten die Standards und die Kontrolle unter -18°C für bis zu 3 Monaten aufbewahrt werden und sollten nur zweimal eingefroren und aufgetaut werden. Wenn die Komponenten der Antikörperlösungen gemischt sind, sollte die verbliebene Lösung bei 2-8°C für nicht länger als 1 Monat aufbewahrt werden oder eingefroren werden unter -18°C. Die verbliebenen Reagenzien und Immunostrips sollten bei 2-8°C aufbewahrt werden.

## Warnungen

Nur für *in-vitro* Anwendung.

- Alle Reagenzien und Ausrüstungen sollten wie infektiöses Material behandelt und entsorgt werden.
- Die Bestandteile des Kits sollten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden und Reagenzien verschiedener Chargen sollten nicht gemischt werden.

## MATERIAL

### Probengewinnung

Bei der Blutentnahme ist Hämolyse zu vermeiden. Das Serum sollte innerhalb 3 Stunden nach der Blutentnahme abgetrennt werden. Es wird empfohlen die Proben sofort einzufrieren (<-18°C). Es kann sowohl Heparin und EDTA zur Gewinnung von Plasma verwendet werden.

### Beigefügtes Material

Ehe der Kit geöffnet wird, bitte den Abschnitt Vorsichtsmassnahmen lesen. Der Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Bestimmungen. Für das Auflösen von lyophilisiertem Material das entsprechende Volumen von destilliertem Wasser hinzufügen und für 10 Minuten stehen lassen vor dem Mischen. Schaumbildung vermeiden.

### Streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten **MICROPLAT**

Mikrowellstreifen (12 x 8 Wells) vorbeschichtet mit Streptavidin. Beigefügt in einem Plastikrahmen.

### Osteocalcinstandard 0 **CAL 0**

Ein Fläschchen (lyophilisiert) beinhaltet eine PBS-gepufferte Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel. Auflösen mit 5.0 mL destilliertem Wasser. Der Standard muss nach Gebrauch unter -18°C aufbewahrt werden.

### Osteocalcinstandard **CAL 1-5**

Fünf Fläschchen (lyophilisiert) beinhalten synthetisches humanes Osteocalcin in PBS-gepufferte Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel. Auflösen mit 0.5 mL destilliertem Wasser. Der genaue Wert für jeden Standard ist auf dem Qualitätskontrollbericht aufgedruckt. Nach Gebrauch muss der Standard unter -18°C aufbewahrt werden und sollte nur zweimal eingefroren und aufgetaut werden.

### Kontrolle **CTRL 1-2**

Zwei Fläschchen (lyophilisiert) beinhaltet synthetisches humanes Osteocalcin in PBS-gepufferte Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel. Auflösen mit 0.5 mL destilliertem Wasser. Die Kontrolle muss unter -18°C aufbewahrt werden und nur zweimal eingefroren und aufgetaut werden. Kontrollbereich dem beigefügtem Qualitätskontrollbericht entnehmen.

### Peroxidasekonjugierter Antikörper **ENZYMCONJ**

Ein Fläschchen (min. 0.25 mL) konzentrierter Lösung des peroxidasekonjugiertem monoklonalen Mausantikörpers spezifisch gegen der N-terminalen Region des Osteocalcins in einer TRIS-gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergentien und Konservierungsmittel. Vor dem Gebrauch 10 mL Konjugatverdünnungslösung hinzufügen.

### Biotinylierter Antikörper **Ab BIOTIN**

Ein Fläschchen (min. 0.25 mL) konzentrierter Konjugatlösung von biotinyliertem monoklonalem Mausantikörpers spezifisch gegen die Mid-region des Osteocalcins in einer TRIS-gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergentien und Konservierungsmittel. Vor dem Gebrauch 10 mL Konjugatverdünnungslösung hinzufügen.

### Konjugatverdünnungslösung **BUF**

Ein Fläschchen (min. 22 mL) PBS-gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergentien und Konservierungsmittel.

### Substratlösung **SUBS TMB**

Ein Fläschchen (min. 12 mL) gebrauchsfertigem Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat in einem sauren Puffer. Das chromogene Substrat kann leicht bläulich erscheinen.

### **Stopplösung** **H2S04**

Ein Fläschchen (min. 12 mL) gebrauchsfertige 0.18 mol/L Schwefelsäure.

### **Waschlösung** **WASHBUF** **50x**

Ein Fläschchen (min. 20 mL) konzentrierter Waschpuffer mit Detergentien und Konzentrationsmittel.

### **Klebestreifen**

Adhesiver Film um die Wells während Inkubation zu bedecken.

### **Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel**

- Behälter zur Vorbereitung der Antikörperlösung und der Waschlösung
- Präzisionsmikropipetten für 20 µL
- Destilliertes Wasser
- Präzisionsmultikanalpipette für 100 µL und 150 µL
- Mikrotiterplattenreader

## **TESTDURCHFÜHRUNG**

**Für die optimale Durchführung des Tests ist es wichtig die Instruktionen wie folgt zu befolgen**

### **Testdurchführung**

Vor dem Gebrauch alle Lösungen vorbereiten und bei Raumtemperatur equilibrieren lassen.

#### **Test bei 18-22°C durchführen.**

Die Anzahl der benötigten Immunostrips für den Test ermitteln. Es wird empfohlen alle Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen. Zusätzlich werden für jede Durchführung 16 Wells für die Standards und Kontrolle benötigt. Die Anzahl der benötigten Immunostrips in den Plastikrahmen plazieren. Unbenutzte Strips in die dicht verschlossene Folienbeutel mit Trockenkapseln aufbewahren.

#### **1. Vorbereitung der Antikörperlösung**

Die Antikörperlösung wird vorbereitet durch 1) hinzufügen von 10 mL Konjugatverdünnungslösung **BUF** zu der peroxidaskonjugierten Antikörperlösung **ENZYMCNJ** und zur biotinylierten Antikörperlösung **Ab BIOTIN**, und 2) beide Konjugate im gleichen Volumenverhältniss mischen.

#### **2. Inkubation in Immunostrips**

20 µL von jeweils **Standard** **CAL** **0-5**, **Kontrolle** **CTRL** **1-2** oder unbekannte Probe in die entsprechenden Wells pipettieren gefolgt von 150 µL der Antikörperlösung. Bedecke die Immunostrips mit dem Klebestreifen und inkubiere für 120±5 Minuten bei 18-22°C (ohne Schütteln).

#### **3. Waschen**

Die Immunostrips 5 mal manuell mit 300 µL Waschpuffer, (**WASHBUF** **50x** 1+50 verdünnt in destilliertem Wasser), waschen. Bei Gebrauch von einem automatischen Plattenwäscher die Instruktionen des Herstellers oder den Richtlinien des Labors folgen. Gewöhnlich sind 5 Waschschritte ausreichend. Nach jedem manuellen oder automatischen Waschschrift sicherstellen, dass die Wells vollständig geleert sind.

#### **4. Inkubation mit chromogener Substratlösung**

100 µL der Substratlösung **SUBS** **TMB** in jedes Well pipettieren und für 15±2 Minuten bei 18-22°C im Dunklen inkubieren (ohne Schütteln). Gebrauche Klebestreifen. Nicht direkt von dem Fläschchen mit dem TMB Substrat pipettieren sondern überführe das benötigte Volumen in einem sauberen Behältnis. Übriggebliebenes Substrat in dem Behältnis sollte verworfen und nicht in Fläschchen TMB zurückgeschüttet werden.

#### **5. Stoppen der Farbreaktion**

100 µL der Stopplösung **H2S04** in jedes Well pipettieren.

#### **6. Absorption messen**

Absorption bei 450 nm mit 650 nm als Referenz innerhalb zwei Stunden messen.

## Einschränkungen des Tests

Wenn die Absorption einer Probe der des **Standard 5** übersteigt, sollte die Probe mit **Standard 0** verdünnt und nochmals gemessen werden.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Gute Labor Praxis (Good Laboratory Practice – GLP) verlangt den Gebrauch von Qualitätskontrollen, die bei jedem Testansatz mitgemessen werden, um die Durchführung des Test zu überprüfen. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt werden. Die Ergebnisse mit den appropriate statistischen Methoden analysieren.

## ERGEBNISSE

### Berechnung der Ergebnisse

Eine 4-parameter log Kurvenanalyse kann benutzt werden

Alternativ wird der Durchschnitt der doppelten Absorptionsbestimmungen errechnet. Eine Standardkurve wird auf Grafikpapier konstruiert durch das Auftragen der durchschnittlichen Absorption der sechs Standards (ordinate) gegen die entsprechende Osteocalcinkonzentration (Abzisse). Ermittelt wird die Osteocalcinkonzentration der Kontrollen und jeder Patientenprobe durch Interpolation.

### Beispiel von ermittelten Resultaten:

Standards/ Kontrollen/ Proben	Osteocalcin (ng/mL)	A <sub>450-650</sub> (nm) Obs 1/ Obs 2	Mittelwert A <sub>450-650</sub> (nm)	Interpolierte Osteocalcin (ng/mL)
Standard 0	0.0	0.019 / 0.020	0.020	
Standard 1	4.2	0.108 / 0.096	0.102	
Standard 2	7.6	0.183 / 0.177	0.180	
Standard 3	19.4	0.627 / 0.656	0.642	
Standard 4	35.4	1.271 / 1.278	1.275	
Standard 5	56.1	1.988 / 1.873	1.931	
Control 1		0.474 / 0.459	0.467	15.1
Control 2		1.147 / 1.132	1.140	31.8
Sample I		0.099 / 0.105	0.102	4.6
Sample II		0.899 / 0.850	0.875	25.1
Sample III		1.412 / 1.375	1.394	38.7

**Bitte beachten:** Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

### Testcharakteristika

*Nachweisgrenze:* 0.5 ng/mL Osteocalcin

Dies Konzentration entspricht 3 Standardabweichungen über dem Mittelwert von 21 Bestimmungen des Nullwertes (Osteocalcin Standard 0).

### Präzision

Die Präzision des N-MID® Osteocalcin ELISA wurde für drei serum Proben ermittelt. Die Inter-assay Variation und die Intra-assay Variation wurde ermittelt durch die Analyse von 3 Proben in 10 aufeinanderfolgende Durchführungen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unter zusammengefasst:

Inter-Assay (n= 10)

Mittelwert	Mittelwert (ng/mL)	Vk (%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

Intra-Assay (n= 10)

Mittelwert	Mittelwert (ng/mL)	Vk (%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

#### Verdünnung/Linearität

Der Messbereich des N-MID® Osteocalcin ELISAs ist zwischen 0.5 ng/mL und 100 ng/mL Osteocalcin. Es wurde untersucht, ob der N-MID® Osteocalcin ELISA test sensitiv für Bestandteile der Serummatrix ist. Vier Serumproben wurden in Standard 0 verdünnt und die Konzentrationen mit dem N-MID® Osteocalcin ELISA bestimmt.

Probe	Verdünnung	Gemessen (ng/mL)	Erwartet (ng/mL)	Wiederfindung (% des erwarteten Wertes)
1	1 / 1	12.0	12.0	100
	1 / 2	5.1	6.0	84
	1 / 4	2.7	3.0	88
	1 / 8			
2	1 / 1	36.1	36.1	100
	1 / 2	18.1	18.1	106
	1 / 4	9.0	9.0	105
	1 / 8	4.7	4.5	104
3	1 / 1	38.2	38.2	100
	1 / 2	20.5	19.1	107
	1 / 4	9.9	9.6	104
	1 / 8	4.3	4.8	90
4	1 / 1	48.1	48.1	100
	1 / 2	23.8	24.1	99
	1 / 4	12.2	12.0	101
	1 / 8	6.3	6.0	105

#### Wiederfindung

Die Genauigkeit des ELISA wurde bestimmt durch spiken von menschlichem Serum mit unterschiedlichen Mengen synthetischen Osteocalcins. Drei Serumproben wurden in gleichen Volumina mit 4 Standardlösungen Osteocalcin gemischt und mit dem N-MID® Osteocalcin ELISA gemessen.

Proben	Standards synthetischen Osteocalcins (ng/mL)	Gemessen (ng/mL)	Erwartet (ng/mL)	Wiederfindung (% des erwarteten Wertes)
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92
	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

### Interferens

Die Interferens von Lipiden auf die Messung von Osteocalcin im Serum bei dem N-MID® Osteocalcin ELISA wurde ermittelt.

Bei unten Angegebenen Konzentrationen wurden keine Interferenzen festgestellt:

Lipid (Intralipid): 15 g/L  
Bilirubin: 200 mg/L  
Hämoglobin: 5 g/L

### Erwartete Ergebnisse

Es ist empfehlenswert, für ein Labor seine eigenen Normwert- und pathologischen Bereiche zu etablieren. Als Beispiel werden die Durchschnittswerte und Standardabweichungen für verschiedene Populationen unten angegeben. Für weitere Daten wird auf die Literaturliste hingewiesen.

Populationen	Anzahl der Individuen	Durchschnittswerte (ng/mL)	95% Confidence Interval
Premenopausal women	77	17.4	8.4 – 33.9
Postmenopausal Frauen	131	26.5	12.8 – 55.0
Männer	85	19.8	9.6 – 40.8

### Tag-zu-Tag Individuelle Variation

Die Tag-zu-Tag intraindividuelle Variation wurde ermittelt durch die Analyse von Serumproben (morgens, nüchtern) von 11 gesunde postmenopausalen Frauen zu fünf Zeitpunkten über 2 Wochen.

Person	Durchschnitt (ng/mL)	SD (ng/mL)	Vk (%)
1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4



## INTRODUZIONE

### Uso del kit

Il kit N-MID® Osteocalcin ELISA è un dosaggio immunoenzimatico a due siti per la determinazione quantitativa dell'osteocalcina umana nel siero e nel plasma.

### Descrizione del metodo

L'osteocalcina, o bone Gla protein (BGP), è la principale proteina non appartenente al collagene della matrice ossea ed è sintetizzata nel tessuto osseo dagli osteoblasti. Ha un peso molecolare di circa 5800 Dalton ed è costituita da 49 aminoacidi e comprende tre residui di acido gamma carbossiglutamico. Dopo la produzione è in parte incorporata nella matrice ossea e in parte rilasciata in circolo. Il ruolo fisiologico dell'osteocalcina non è stato ancora chiarito, ma un gran numero di studi ha evidenziato che i livelli circolanti di osteocalcina riflettono la velocità di formazione di tessuto osseo.

La determinazione dei livelli circolanti di osteocalcina è utile per identificare le donne a rischio per osteoporosi, per valutare il metabolismo del tessuto osseo durante la perimenopausa e la post menopausa, durante la terapia ormonale sostitutiva e nel trattamento di donne in pre menopausa con agonisti di LH-RH e in pazienti con deficit di GH, ipotiroidismo, ipertiroidismo o insufficienza renale cronica. (I riferimenti bibliografici sono riportati alla fine del manuale)

### Principio del metodo

Il metodo è basato sull'uso di due anticorpi monoclonali altamente specifici. L'anticorpo di cattura, legato a biotina, riconosce la regione intermedia (aa. 20-29) dell'osteocalcina umana, l'anticorpo di segnale, legato a perossidasi, ne riconosce la porzione N-terminale (aa. 10-16).

Il kit è in grado di riconoscere sia l'osteocalcina intatta (aa. 1-49) che il frammento N-terminale-medio molecolare (aa. 1-43).

Standard (osteocalcina sintetica), controlli e campioni vengono pipettati in pozzetti di una micropiastra in cui è legata streptavidina.

Viene quindi aggiunta una soluzione contenente l'anticorpo biotinilato e l'anticorpo coniugato con perossidasi; si forma così un complesso tra osteocalcina, anticorpo biotinilato e anticorpo coniugato con perossidasi che si lega alla fase solida attraverso l'interazione tra biotina e streptavidina.

Al termine dell'incubazione, si lava la micropiastra e si aggiunge il substrato (TMB); dopo 15 minuti si blocca la reazione con acido solforico e si misura l'assorbanza dei pozzetti.

### Schema del dosaggio

20+150 µL Incubare 2 ore a temperatura ambiente (18-22°C). Lavare 100 µL Incubare 15 min. Arrestare la reazione. Leggere a 450-650nm 1 Pozzetti sensibilizzati con streptavidina 2 Pipettare standard, controllo e campioni 3 Aggiungere il coniugato+Mab biotinilato 3 Aggiungere il substrato (TMB).

## PRECAUZIONI

### Attenzione

- I reattivi e il materiale di laboratorio deve essere manipolato ed eventualmente eliminato come se fosse potenzialmente infettivo.
- Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza e non utilizzare insieme reattivi di lotti diversi.

### Conservazione dei reattivi

Il kit non ancora utilizzato deve essere conservato a 2-8°C. In queste condizioni è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

Dopo ricostituzione standard e controlli devono essere conservati a temperatura inferiore a -18°C; possono essere scongelati solo due volte.

La soluzione di lavoro degli anticorpi è stabile per 1 mese a 2-8°C e fino alla data di scadenza riportata sulla confezione a temperatura inferiore a -18°C.

Gli altri reattivi e le strip devono essere conservati a 2-8°C.

## MATERIALI

### Raccolta dei campioni

Prelevare sangue venoso facendo attenzione a non emolizzare il campione. Separare il siero dalla parte corpuscolata entro tre ore dal prelievo. Congelare immediatamente a < -18°C I campioni. E' possibile utilizzare anche plasma da EDTA, da eparina o da citrato.

### Reattivi forniti

Prima di utilizzare il kit, leggere la sezione Precauzioni di questo manuale. Il kit contiene reattivi sufficienti per 96 determinazioni.

Risospendere il materiale liofilizzato con il volume appropriato di acqua distillata e attendere almeno 10 minuti prima di mescolarlo per inversione.

### **Micropiastra** **MICROPLAT**

12 strip da 8 pozzetti ciascuna fornite in un telaio di plastica, sensibilizzate con streptavidina.

### **Standard 0** **CAL 0** **1 flacone x min. 5 mL**

Tampone PBS liofilizzato, contenente uno stabilizzante delle proteine e conservanti.

Ricostituire con 5 mL di acqua distillata; dopo l'uso conservare a temperatura inferiore a -18°C.

### **Standard** **CAL 1-5** **5 flaconi x min. 0.5 mL**

Standard a 5 livelli di osteocalcina umana sintetica in tampone PBS liofilizzati, contenente uno stabilizzante delle proteine e conservanti.

Ricostituire con 0.5 mL di acqua distillata; dopo l'uso conservare a temperatura inferiore a -18°C. Gli standard ricostituiti possono essere congelati e scongelati solo due volte.

Il valore esatto di ciascuno standard è stampato sull rapporto del controllo di qualità.

### **Controllo** **CTRL 1-2** **2 flacone x min. 0.5 mL**

Osteocalcina umana sintetica in tampone PBS liofilizzata, contenente uno stabilizzante delle proteine e conservanti. Ricostituire con 0.5 mL di acqua distillata; dopo l'uso conservare a temperatura inferiore a -18°C. Il controllo ricostituito può essere congelato e scongelato solo due volte. I valori di riferimento sono riportati sull rapporto del controllo di qualità accluso al kit.

### **Anticorpo coniugato con perossidasi** **ENZYMCONJ**

1 flacone x min. 0.25 mL. Anticorpo monoclonale concentrato diretto contro la regione N-terminale dell'osteocalcina umana, coniugato con HRP, in tampone TRIS contenente uno stabilizzante delle proteine, detergenti e conservanti. Diluire con 10 mL di diluente per il coniugato.

### **Anticorpo biotilato** **Ab BIOTIN** **1 flacone x min. 0.25 mL.**

Anticorpo monoclonale concentrato biotilato, diretto contro la regione intermedia dell'osteocalcina umana, in tampone TRIS contenente uno stabilizzante delle proteine, detergenti e conservanti. Diluire con 10 mL di diluente per il coniugato.

### **Diluente per il coniugato** **BUF** **1 flacone x min. 22 mL**

Tampone PBS pronto per l'uso, contenente uno stabilizzante delle proteine, detergenti e conservanti.

### **Substrato** **SUBS TMB** **1 flacone x min. 12 mL.**

Soluzione pronta per l'uso di TMB.

### **Soluzione di stop** **H2SO4** **1 flacone x min. 12 mL.**

Soluzione pronta per l'uso di Acido solforico 0.18 M.

### **Tampone di lavaggio** **WASHBUF 50x**

1 flacone x min. 20 mL. Tampone di lavaggio concentrato, contenente detergenti e conservanti. Diluire 1+50 con acqua distillata.

Copripiastra adesivo

### **Materiale richiesto ma non fornito**

- Vetreria per preparare la soluzione di lavoro dell'anticorpo e la soluzione di lavaggio.
- Micropipette di precisione per 20 µL.
- Acqua distillata.
- Multipipette di precisione a 8 o 12 canali per 100 µL e 150 µL.
- Lettore di micropiastre.

### **METODO DEL DOSAGGIO**

Portare prima dell'uso tutti i reattivi a temperatura ambiente. Eseguire il dosaggio a temperatura ambiente.

Determinare il numero di strip necessarie per il dosaggio. Eseguire il dosaggio in duplicato. Per ogni esperimento sono necessari 16 pozzetti per standard e controllo. Sistemare le strip nel telaietto. Riporre le strip non utilizzate nella busta con il dissecante. Chiudere con cura la busta.

#### **1 Preparazione della soluzione di lavoro dell'anticorpo:**

Preparare la soluzione di lavoro dell'anticorpo aggiungendo 10 mL di diluente per il coniugato **BUF** all'anticorpo coniugato con perossidasi **ENZYMCONJ** e all'anticorpo biotinilato **Ab BIOTIN**. Mescolare in parti uguali le due soluzioni.

#### **2 Incubazione**

Pipettare 20 µL di standard **CAL 0-5**, controllo **CTRL 1-2** e campioni nei rispettivi pozzetti. Aggiungere con una multipipetta 150 µL di soluzione di lavoro dell'anticorpo. Coprire con il copripietra e incubare 2 ore±5 minuti a temperatura ambiente (18-22°C), senza agitazione.

#### **3 Lavaggio**

Lavare 5 volte le strisce con 300 µL tampone di lavaggio (**WASHBUF 50x** diluito 1+50 con acqua distillata). Se si usa un lavatore automatico, seguire le istruzioni del produttore. Di solito 5 cicli di lavaggio sono sufficienti. Verificare che tra un ciclo e l'altro di lavaggio i pozzetti vengano aspirati completamente.

#### **4 Incubazione con il substrato**

Pipettare 100 µL di soluzione di substrato **SUBS TMB** in tutti i pozzetti e incubare 15±2 minuti a temperatura ambiente (18-22°C) al buio senza agitazione. Coprire con un copripietra.

#### **5 Arresto della reazione**

Pipettare 100 µL di soluzione di stop **H2SO4** in tutti i pozzetti.

#### **6 Misura dell'assorbanza**

Misurare l'assorbanza a 450 nm entro due ore.

### **Limiti del metodo**

Se l'assorbanza di un campione è superiore a quella dello standard più elevato (standard 5), è necessario diluire il campione con lo standard 0 e ridosarlo.

### **CONTROLLO DI QUALITA'**

La "Good Laboratory Practice" (GLP) richiede che vengano inseriti in ogni esperimento sieri di controllo per verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come i campioni e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

## RISULTATI

### Calcolo dei risultati

Calcolare la media delle assorbanze dei duplicati, sottrarre l'assorbanza dello standard 0 (bianco) e costruire una curva standard su carta millimetrata, ponendo in ordinata la media delle assorbanze dei 5 standard e in ascissa le concentrazioni di osteocalcina corrispondenti. Determinare per interpolazione la concentrazione di osteocalcina in campioni e controlli. In alternativa è possibile utilizzare un'interpolazione computerizzata a 4 parametri.

### Esempio dei risultati che si ottengono in un dosaggio:

Standard/ Controllo/ Campioni	Campioni (ng/mL)	A <sub>450-650</sub> (nm)	Media A <sub>450-650</sub> (nm)	Interpolata di Osteocalcin (ng/mL)
Standard 0	0.0	0.019 / 0.020	0.020	
Standard 1	4.2	0.108 / 0.096	0.102	
Standard 2	7.6	0.183 / 0.177	0.180	
Standard 3	19.4	0.627 / 0.656	0.642	
Standard 4	35.4	1.271 / 1.278	1.275	
Standard 5	56.1	1.988 / 1.873	1.931	
Controllo 1		0.474 / 0.459	0.467	15.1
Controllo 2		1.147 / 1.132	1.140	31.8
Sample I		0.099 / 0.105	0.102	4.6
Sample II		0.899 / 0.850	0.875	25.1
Sample III		1.412 / 1.375	1.394	38.7

**Nota: I dati sopra riportati sono solo esemplificativi e non devono essere utilizzati per calcolare i risultati dei singoli dosaggi.**

### Caratteristiche del metodo

*Concentrazione minima rilevabile:* 0.5 ng/mL

La concentrazione minima rilevabile è la concentrazione di osteocalcina corrispondente a due DS oltre la media delle assorbanze di 21 determinazioni dello standard zero.

### Imprecisione

E' stata valutata l'imprecisione del kit dosando 3 campioni di siero (basso, intermedio, elevato). I risultati sono riportati nella successiva tabella.

#### Variazione intrasaggio (n=10)

Media	Deviazione standard (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

#### Variazione inter saggio (n=10)

Media	Deviazione standard (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

### Diluizione

E' stata studiata la sensibilità del dosaggio all'effetto matrice. Quattro campioni di siero sono stati diluiti con lo standard zero (standard 0) e la loro concentrazione di osteocalcina è stata determinata con il kit N-MID® Osteocalcin ELISA.

Campione	Diluizione	Osservata (ng/mL)	Attesa (ng/mL)	Recupero (%)
1	1 / 1	12.0	12.0	100
	1 / 2	5.1	6.0	84
	1 / 4	2.7	3.0	88
	1 / 8			
2	1 / 1	36.1	36.1	100
	1 / 2	18.1	18.1	106
	1 / 4	9.0	9.0	105
	1 / 8	4.7	4.5	104
3	1 / 1	38.2	38.2	100
	1 / 2	20.5	19.1	107
	1 / 4	9.9	9.6	104
	1 / 8	4.3	4.8	90
4	1 / 1	48.1	48.1	100
	1 / 2	23.8	24.1	99
	1 / 4	12.2	12.0	101
	1 / 8	6.3	6.0	105

### Recupero

E' stata studiata l'accuratezza del dosaggio, aggiungendo quantità diverse di osteocalcina sintetica a campioni di siero con concentrazioni endogene differenti di osteocalcina. A tre campioni di siero sono stati aggiunte in uguale volume 4 diverse soluzioni standard con concentrazioni di osteocalcina comprese tra 6,3 e 100 ng/mL. La loro concentrazione di osteocalcina è stata determinata con il kit N-MID® Osteocalcin ELISA.

Campione	Standard di Conc. osteocalcina sintetica (ng/mL)	Osservata (ng/mL)	Attesa (ng/mL)	Recupero (%)
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92
	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

### Measuring Range

The measuring range for N-MID® Osteocalcin ELISA is between 0.5 ng/mL and 100 ng/mL osteocalcin.

### Interference:

In the concentration listed below no interference was detected:

Lipid (IntraLipid): 15 g/L  
Bilirubin: 200 mg/L  
Hemoglobin: 5 g/L

### Valori attesi

Ogni laboratorio deve stabilire propri intervalli di riferimento per soggetti normali e patologici. I valori riportati nella seguente tabella, media, deviazione standard e intervallo di fiducia al 95%, vengono forniti a titolo di esempio. Per approfondimenti si rimanda alla bibliografia.

Popolazione	Numero di soggetti	Valore medio (ng/mL)	95% Confidence Interval
Donne in pre-menopausa	77	17.4	8.4 – 33.9
Donne in post-menopausa	131	26.5	12.8 – 55.0
Uomini	85	19.8	9.6 – 40.8

### Variazione giornaliera individuale:

E' stata valutata la variazione giornaliera individuale dosando 5 campioni di siero prelevati il mattino in giorni differenti in due settimane da 11 donne in post menopausa apparentemente sane e a digiuno dalla mezzanotte.

Subject	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4

## INTRODUCCION

### Aplicaciones

El kit N-MID® Osteocalcin ELISA es un ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de osteocalcina, como un indicador de la actividad osteoblástica en suero y plasma humano y se ha **diseñado para utilizarse como una herramienta en la prevención de la osteoporosis.**

### Limitaciones

Los valores de la osteocalcina pueden variar con la edad de la persona (edades posteriores a la menopausia), con los “ritmos circadianos”, con el nivel de filtración glomerular y duración del tratamiento.

Los resultados deberían analizarse en conjunto con el resto de datos clínicos disponibles y con otros parámetros diagnósticos. Por todo ello, no se recomienda utilizar los valores de osteocalcina como un procedimiento para la detección de la presencia de osteoporosis en la población en general. Tampoco deberían realizarse cambios o paralizaciones en la medicación basándose únicamente en los valores de la osteocalcina.

Cuando se realicen evaluaciones consecutivas de las muestras, deberían extraerse en el mismo momento del día como valor basal, y utilizar el mismo tipo de muestra, suero o plasma con anticoagulantes.

### Sumario y explicación del test

La osteocalcina, o proteína ósea Gla (BGP), es la principal proteína no colagénica de la matriz ósea. Tiene un peso molecular aproximado de 5800 Dalton y consta de 49 aminoácidos, incluyendo tres residuos del ácido carboxiglutámico gamma.

Se sintetiza en el hueso por los osteoblastos. Tras su producción, se incorpora en la matriz ósea y se libera parcialmente al torrente circulatorio. La función fisiológica precisa de la osteocalcina no se conoce en la actualidad. Un gran número de estudios han demostrado que el nivel de osteocalcina circulante refleja la proporción de formación ósea (1-14).

Se ha demostrado que la determinación de los niveles séricos de osteocalcina supone una herramienta valiosa en la identificación de las mujeres con riesgo de sufrir osteoporosis, en la monitorización del metabolismo óseo durante la perimenopausia y postmenopausia y durante la terapia antiresorptiva.

### Principio del ensayo

El kit N-MID® Osteocalcina ELISA está basado en la utilización de dos anticuerpos monoclonales (Mabs) altamente específicos frente a la osteocalcina humana. Un anticuerpo reconoce la región media (aa 20-29) y se utiliza como anticuerpo de captura y para la detección se utiliza un anticuerpo conjugado con peroxidasa que reconoce la región N-terminal (aa 10-16). Además de la osteocalcina intacta (aa 1-49) también se detecta el fragmento amino medio-terminal (aa 1-43).

Se añaden los estándares, los controles, y las muestras a los micropocillos apropiados recubiertos con estreptavidina. Se añade después una mezcla de anticuerpos biotinilados y de anticuerpos conjugados con peroxidasa. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente se lavan los pocillos y se añade el sustrato cromogénico. La reacción colorimétrica se para con ácido sulfúrico. Finalmente se mide la absorbancia.

## PRECAUCIONES

Deben tenerse en cuenta las siguientes precauciones:

- No comer, no beber, no fumar ni aplicar cosméticos en las zonas de manipulación de los materiales para el ensayo.
- No pipetear con la boca
- Utilizar guantes para la manipulación del material, y lavar las manos después
- Cubrir la zona de trabajo, con papel absorbente

## Almacenamiento

El kit N-MID® Osteocalcina ELISA debe almacenarse a 2-8°C tras su recepción. En estas condiciones el kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. Tras la reconstitución, los **estándares** y los **controles** deberían almacenarse a -18°C o temperatura inferior hasta 3 meses, y no deberían someterse a más de un ciclo de congelación- descongelación. Cuando se hayan mezclado los componentes de la **solución de anticuerpo**, la solución restante debería almacenarse a 2-8°C por un periodo inferior a un mes o a temperatura inferior a -18°C. El resto de los reactivos y las tiras deberían almacenarse a 2-8°C.

## Advertencia

Para uso *In vitro*.

- Todos los reactivos y material de laboratorio utilizado debería manipularse y eliminarse como si se tratase de muestras capaces de transmitir infección.
- No utilizar Kit caducados. No mezclar reactivos de lotes diferentes

## MATERIALES

### Recolección de la muestra

Extraer la sangre por venopunción, evitando la hemólisis. Separar el suero de las células, dentro de las 3 horas siguientes a la recogida de la muestra. Se recomienda congelar la muestra a -18°C inmediatamente.

Cuando se analicen muestras de plasma, pueden utilizarse tanto heparina como EDTA.

### Materiales suministrados en el Kit

Antes de abrir el Kit, leer las precauciones. El Kit contiene reactivos suficientes para 96 determinaciones. Para la reconstitución del material liofilizado añadir el volumen apropiado de agua destilada y dejar reposar durante 10 minutos antes de mezclar. Evitar la formación de espuma.

### **Microplaca recubierta de estreptavidina** **MICROPLAT**

Tiras de micropocillos (8 X 12) previamente recubiertos de estreptavidina. Se suministran en un soporte de plástico.

### **Estándar de Osteocalcina 0** **CAL 0**

Un vial (liofilizado) que contiene tampón PBS con proteína estabilizadora y conservante. Reconstituir con 5 mL de agua destilada. Los estándares deben congelarse a -18°C tras su utilización.

### **Estándares de Osteocalcina** **CAL 1-5**

Cinco viales (liofilizados) de osteocalcina humana sintética en tampón PBS con proteína estabilizadora y conservante. Reconstituir con 0.5 mL de agua destilada. El valor exacto de cada estándar está indicado en el informe de control de calidad. Los estándares deben congelarse a -18°C tras su utilización y deberían someterse únicamente a dos ciclos de congelación y descongelación.

### **Control** **CTRL 1-2**

Un vial (liofilizado), de osteocalcina humana sintética en tampón PBS con proteína estabilizadora y conservante. Reconstituir con 0.5 mL de agua destilada. El control debe congelarse a -18°C tras su utilización y debería someterse únicamente a dos ciclos de congelación y descongelación. Ver el informe de control de calidad para el rango de los controles.

### **Anticuerpo conjugado con Peroxidasa** **ENZYMCONJ**

Un vial de (min. 0.25 mL) solución concentrada del anticuerpo monoclonal murino conjugado con peroxidasa que reconoce la región N-terminal de la osteocalcina en tampón TRIS con proteína estabilizadora, detergente y conservante. Antes de su utilización, añadir 10 mL de solución del diluyente del conjugado.

### **Anticuerpo Biotinilado** **Ab BIOTIN**

Un vial de (min. 0.25 mL) de solución concentrada del conjugado

Del anticuerpo monoclonal murino biotinilado que reconoce la región media de la osteocalcina en tampón TRIS con proteína estabilizadora, detergente y conservante. Antes de su utilización, añadir 10 mL de solución del diluyente del conjugado.



### **Solución del Diluyente del Conjugado** **BUF**

Un vial (min. 22mL) de tampón PBS con proteína estabilizadora, detergente y conservante.

### **Solución de Substrato** **SUBS** **TMB**

Un vial (min 12 mL) listo para usar de TMB substrato listo para usar en un tampón ácido.  
El substrato cromogénico debe aparecer como azul muy claro.

### **Solución de Parada** **H2SO4**

Un vial (min. 12 mL) listo para usar 0,18 mol/L de ácido sulfúrico

### **Solución de lavado** **WASHBUF** **50x**

Un vial (min. 20 mL) de tampón de lavado concentrado con detergente y conservante. Diluir 1+50 en agua destilada antes de su utilización.

### **Cubierta Adhesiva**

Plástico adhesivo para cubrir la microplaca durante la incubación.

### **Materiales Necesarios y no suministrados**

- Recipientes para preparar la solución con el anticuerpo y la solución de lavado
- Pipetas 20 µL
- Agua destilada
- Multipipeta de 8-12 canales para suministrar 100 µL y 150 µL
- Lector de microplacas con filtros para 450 nm y 650 nm.

## **PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

**Para la optimización de los resultados es importante ajustarse rigurosamente a las instrucciones de uso que se proporcionan**

### **Procedimiento del ensayo**

Antes de su utilización, preparar las soluciones y dejar que alcancen la temperatura ambiente. **Realizar el ensayo a una temperatura de 18-22°C.**

Determinar el número de tiras que se requieren para el ensayo. Se recomienda que todas las muestras se analicen por duplicado. Además, se necesita un total de 16 pocillos por ensayo para los estándares y los controles. Colocar el número de tiras que se necesiten en su soporte. Colocar las tiras sin usar en la bolsa de aluminio bien cerrada con el desecante en su interior.

### **1. Preparación de la Solución de anticuerpo**

La solución de anticuerpo se prepara:

- 1) Añadiendo 10 mL de la Solución del Diluyente del Conjugado **BUF** a la Solución del Anticuerpo Conjugado con Peroxidasa **ENZYMCNJ** y a la Solución del Anticuerpo Biotinilado **Ab BIOTIN** y 2) Mezclando las dos soluciones en volúmenes iguales.

### **2. Incubación en las tiras**

Pipetear 20 µL de cada estándar **CAL 0-5**, Control **CTRL 1-2** o la muestra desconocida en los pocillos correspondientes y 150 µL de la solución del Anticuerpo. Tapar los micropocillos con la cubierta adhesiva e incubar durante 120±5 minutos a temperatura ambiente (18-22°C) sin mezclar.

### **3. Lavado**

Se procede a realizar 5 lavados con 300 µL solución de lavado (**WASHBUF 50x** diluida 1+50 en agua destilada). Si se utiliza un lavador automático de placas, seguir las instrucciones del fabricante o el protocolo del laboratorio. En general son adecuados 5 ciclos de lavado. Es importante asegurarse de que los pocillos, quedan completamente vacíos después de cada ciclo de lavado automático o manual.

#### 4. Incubación con el sustrato cromogénico

Pipetear 100 µL de Solución sustrato **SUBS TMB** dentro de cada pocillo e incubar durante 15±2 minutos a temperatura ambiente (18-22°C) en oscuridad (sin mezclar). Tapar con la cubierta adhesiva. No pipetear directamente desde el vial que contiene el sustrato TMB. Depositar el volumen necesario en un recipiente limpio. La solución de sustrato que sobre, deberá ser desechada y no debe retornarse al nivel TMB.

#### 5. Interrupción de la reacción colorimétrica

Pipetear 100 µL de la solución de parada **H2S04** en cada pocillo.

#### 6. Medida de la absorbancia

Medida de la absorbancia a 450 nm utilizando un filtro de 650 nm como referencia dentro de las siguientes dos horas a la interrupción de la reacción.

#### Limitaciones del procedimiento

Si la absorbancia de la muestra supera al **estándar 5**, la muestra deberá ser diluida en el **Estándar 0**, y se volverá a analizar.

### CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas del Laboratorio requieren la utilización de muestras como control de calidad en cada serie, para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles se deberán ensayar de igual forma que las muestras desconocidas, y los resultados deberán ser analizados con los métodos estadísticos apropiados.

### RESULTADOS

#### Calculo de los resultados

Puede utilizarse un ajuste de curva por mínimos cuadrados.

De forma alternativa, se puede calcular la media de las determinaciones de absorbancia obtenidas por duplicado.

Se representa la media de la absorbancia de los seis estándares en las ordenadas, frente a sus correspondientes concentraciones de osteocalcina en abscisas. Se determina la concentración de osteocalcina de los controles y de cada una de las muestras del paciente por interpolación con la curva estándar.

#### Ejemplo de los resultados obtenidos:

Estándares/ controles/ muestras	Osteocalcina (ng/mL)	A <sub>450-650</sub> (nm)	Media A <sub>450-650</sub> (nm)	Osteocalcina por extrapolación (ng/mL)
		Obs 1/ Obs 2		
Estándar 0	0.0	0.019 / 0.020	0.020	
Estándar 1	4.2	0.108 / 0.096	0.102	
Estándar 2	7.6	0.183 / 0.177	0.180	
Estándar 3	19.4	0.627 / 0.656	0.642	
Estándar 4	35.4	1.271 / 1.278	1.275	
Estándar 5	56.1	1.988 / 1.873	1.931	
Control 1		0.474 / 0.459	0.467	15.1
Control 2		1.147 / 1.132	1.140	31.8
Sample 1		0.099 / 0.105	0.102	4.6
Sample 2		0.899 / 0.850	0.875	25.1
Sample 3		1.412 / 1.375	1.394	38.7

**NOTA :** Los datos que aparecen en la tabla, son meramente ilustrativos y no deberían utilizarse para calcular los resultados de ningún otro ensayo.

### Características del ensayo

*Límite de detección:* 0.5 ng/mL de osteocalcina

Esta es la concentración correspondiente a tres desviaciones estándar de la Media de 21 determinaciones del blanco (“estándar 0 de osteocalcina”).

### Precisión

La precisión del kit N-MID® Osteocalcin ELISA fue evaluada en tres muestras de suero. La variación inter-ensayo se evaluó utilizando 3 muestras en 10 ensayos consecutivos. La variación intra-ensayo se evaluó utilizando 3 muestras en 10 ensayos consecutivos. Los resultados son resumidos en la tabla de abajo:

Variación Inter ensayo (n=10)

Variación Intra ensayo (n=10)

Media	SD (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.2	5.1
26.2	0.7	2.7
53.9	2.3	4.2

Media	SD (ng/mL)	CV (%)
6.7	0.1	1.3
26.2	0.4	1.8
53.9	1.2	2.2

### Dilución / Linealidad

Se investigó si el kit N-MID® Osteocalcin ELISA era sensible a cualquier efecto de la matriz del suero. Se diluyeron 4 muestras de suero en el estándar 0, y se determinaron las concentraciones en el N-MID® Osteocalcin ELISA.

Muestra	Dilución	Observada (ng/mL)	Esperada (ng/mL)	Recuperación (% de valores esperados)
1	1 / 1	12.0	12.0	100
	1 / 2	5.1	6.0	84
	1 / 4	2.7	3.0	88
	1 / 8			
2	1 / 1	36.1	36.1	100
	1 / 2	18.1	18.1	106
	1 / 4	9.0	9.0	105
	1 / 8	4.7	4.5	104
3	1 / 1	38.2	38.2	100
	1 / 2	20.5	19.1	107
	1 / 4	9.9	9.6	104
	1 / 8	4.3	4.8	90
4	1 / 1	48.1	48.1	100
	1 / 2	23.8	24.1	99
	1 / 4	12.2	12.0	101
	1 / 8	6.3	6.0	105

### Recuperación:

La exactitud de kit N-MID® Osteocalcin ELISA se determinó por la adición de cantidades diferentes de osteocalcina sintética a muestras de suero humano. Se mezclaron 3 muestras de suero en volúmenes iguales con 4 soluciones estándar y se ensayaron con el kit N-MID® Osteocalcin ELISA.

Muestra	Dilución	Observada (ng/mL)	Esperada (ng/mL)	Recuperación (% de valores esperados)
1	50	26.9	30.5	88
	25	16.4	18.0	91
	12.5	10.7	11.7	92
	6.3	8.4	8.6	98
2	50	30.8	35.6	87
	25	19.9	20.6	97
	12.5	14.6	14.3	102
	6.3	11.0	11.2	98
3	50	37.5	40.5	93
	25	26.6	28.0	95
	12.5	21.2	21.7	98
	6.3	18.6	18.6	100

#### Rango de Valores

El rango de valores para la cuantificación de osteocalcina con el kit de N-MID® Osteocalcin ELISA se encuentra entre 0.5 ng/mL y 100 ng/mL

#### Interferencia:

Se estudió la interferencia de los Lípidos en la cuantificación de osteocalcina en muestras de suero con el kit de N-MID® Osteocalcin ELISA. No se detectó interferencia a las concentraciones que se indican más abajo:

Lípidos (intraLípidos):	15 g/L
Bilirrubina:	200 mg/L
Hemoglobina:	5 g/L

#### Valores Esperados

El laboratorio establecerá sus propios valores patológicos y normales. En la tabla de abajo se dan valores medios y desviaciones estándar en varias Poblaciones, como ejemplo. Para más información, ver lista de referencias.

Poblaciones	Número de individuos	Valores medios (ng/mL)	95% Confidence Interval
Mujeres Pre-menopáusicas	77	17.4	8.4 – 33.9
Mujeres post-menopáusicas*	131	26.5	12.8 – 55.0
Hombres	85	19.8	9.6 – 40.8

\* El promedio de años después de la menopausia es de 10.3.

#### Variación individual día a día

La variación individual día a día fue calculada analizando las muestras de suero (primera hora de la mañana) de 11 mujeres sanas post menopáusicas, cinco veces durante 2 semanas.









Individuo	Media (ng/mL)	DS (ng/mL)	CV (%)
1	22.0	3.5	16
2	13.4	1.0	7
3	19.6	1.3	7
4	18.0	3.1	17
5	12.9	1.1	9
6	9.9	0.9	9
7	14.4	2.2	15
8	7.5	0.4	5
9	15.3	2.2	15
10	14.5	1.6	11
11	14.8	0.6	4

## REFERENCES

1. Bjarnason NH. et al., Tibolone: prevention of bone loss in late postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81: 2419-2422.
2. Christiansen C. et al., Dose dependent effects on bone resorption and formation of intermittently administered intravenous ibandronate. *Osteoporos Int* (2003) 14: 609-613.
3. Junqueira PA. et al., Comparison of bone remodeling indicators in climacteric women. *Int J Fertil Womens Med* (2002) 47: 174-181.
4. Marcus R. et al., The relationship of biochemical markers of bone turnover to bone density changes in postmenopausal women: results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *J Bone Mineral Res* (1999) 14: 1583-1595.
5. McClung M. et al., Alendronate prevents postmenopausal bone loss in women without osteoporosis. A double-blind, randomized, controlled trial. Alendronate Osteoporosis Prevention Study Group. *Ann Intern Med* (1998) 128: 253-261.
6. Meunier P. et al., Prevention of early postmenopausal bone loss with cyclical etidronate therapy (a double-blind, placebo-controlled study and 1-year follow-up). *J Clin Endocrinol Metab* (1997) 82: 2784-2791.
7. Ohishi T. et al., Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* (1998) 118: 126-130.
8. Ravn P. et al., Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate treatment: prediction of bone mass changes during treatment. *Bone* (1998) 22: 559-564.
9. Ravn P. et al., Biochemical markers can predict the response in bone mass during alendronate treatment in early postmenopausal women. Alendronate Osteoporosis Prevention Study Group. *Bone* (1999) 24: 237-244.
10. Ravn P. et al., High bone turnover is associated with low bone mass and spinal fracture in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* (1997) 60: 255-260.
11. Ravn P. et al., The effect on bone mass and bone markers of different doses of ibandronate: a new bisphosphonate for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: a 1-year, randomized, double-blind, placebo-controlled dose-finding Study. *Bone* (1996) 19: 527-533.
12. Rosenquist C. et al., Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* (1995) 41:1439-1445.
13. Takahashi M. et al., Comparison of the analytical and clinical performance characteristics of an N-MID versus an intact osteocalcin immunoradiometric assay. *Clin Chim Acta* (2000) 294:67-76.
14. Tanko LB. et al., Oral ibandronate: changes in markers of bone turnover during adequately dosed continuous and weekly therapy and during different suboptimally dosed treatment regimens. *Bone* (2003) 32: 687-693.





 EXP	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusque</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyty przed</i>	 LOT	GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzzszám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
 REF	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalógové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for &lt;n&gt; tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für &lt;n&gt; Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para &lt;n&gt; ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro &lt;n&gt; testů</i> SK <i>Obsah postačuje na &lt;n&gt; stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma &lt;n&gt; vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie &lt;n&gt; testów</i>	 IVD	GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomocka in vitro</i> GR <i>In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérsékletartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzeżać zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>



Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd).

**UK** Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd), 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD

Tel: +44 (0) 191 519 0660 • Fax: +44 (0) 191 519 0760 • e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

**USA** Immunodiagnostic Systems Inc (IDS Inc.), P.O. Box 17063, Fountain Hills, AZ 85269-7063

Tel: 480-836-7435 • Fax: 480-836-7437 • e-mail: info.us@idsplc.com • www.idsplc.com

**Germany** Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH), Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main

Tel: +49 (0) 69 3085-5025 • Fax: +49 (0) 69 3085-5125 • e-mail: info.de@idsplc.com • www.idsplc.com

**France** Immunodiagnostic Systems France SA (IDS France SA), 153 Avenue D'Italie, 75013 PARIS

Tel: +33 (0)1 40 77 04 50 • Fax: +33 (0)1 40 77 04 55 • e-mail: info.fr@idsplc.com • www.idsplc.com

**Scandinavia** Immunodiagnostic Systems Nordic a/s (IDS Nordic a/s), Marielundvej 30, 2. Sal, 2730 Herlev, Denmark

Tel:+45 44 84 0091 • Fax:+45 44 84 0092 • email: info.nordic@idsplc.com • www.idsplc.com