

Ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός για ποσοτικοποίηση της άθικτης οστεοκαλσίνης στον ορό ή πλάσμα

MicroVue™ Osteocalcin EIA Περίληψη

Προετοιμασία Αντιδραστηρίων και Δειγμάτων

- Προετοιμάστε Ρυθμιστικό Διαλύματος Πλύσης 1X (Αραιώστε Διάλυμα Πλύσης 10X 1:10 με απιονισμένο νερό)
- Ανασυστήστε τα Πρότυπα και τους Μάρτυρες με 0,5 mL από το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X (μην τους αφήσετε να παραμείνουν στους 20–25°C για περισσότερο από 2 ώρες)

Διαδικασία Ανάλυσης

Προσθέστε **25 μL** Προτύπου, Μάρτυρα ή δείγματος σε κάθε πηγαδάκι των Επικαλυμμένων Λωρίδων

Προσθέστε **125 μL** Αντί-Οστεοκαλσίνης σε κάθε πηγαδάκι

Επώαστε για **2 ώρες (± 10 λεπτά)** στους 20–25°C

- Παρασκευάστε Σύζευγμα Ενζύμου mit με 10 mL Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X (Αφήστε το δίσκιο να διαλυθεί πλήρως.)

Πλύσιμο **3X** με 1X
Διάλυμα Πλύσης

Προσθέστε **150 μL** Συζεύγματος Ενζύμου που προέρχεται από ανασύσταση σε κάθε πηγαδάκι

Επώαστε επί **60 λεπτά (± 5 λεπτά)** στους 20–25°C

- Παρασκευάστε Διάλυμα Εργασίας Υποστρώματος (30 – 60 λεπτά πριν από τη χρήση) Τοποθετήστε ένα Δίσκιο Υποστρώματος σε κάθε απαιτούμενη φιάλη με Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος (Ανακινήστε καλά τη φιάλη (τις φιάλες) για να αναμιχθούν πλήρως)

Πλύσιμο **3X** με 1X
Διάλυμα Πλύσης

Προσθέστε **150 μL** Διάλυμα Εργασίας Υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι

Επώαστε επί **35–40 λεπτά** στους 20–25°C

Προσθέστε **50 μL** Διαλύματος Παύσης σε κάθε πηγαδάκι

Διαβάστε την οπτική πυκνότητα στα 405 nm. Χρησιμοποιήστε για δημιουργία καμπύλης με εξίσωση προσέγγισης 4 παραμέτρων για να αναλύσετε τα αποτελέσματα της ανάλυσης

$$y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$$

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Ο ανοσοπροσδιορισμός MicroVue ΤΗΣ Οστεοκαλσίνης χρησιμοποιείται για ποσοτική μέτρηση της άθικτης (de novo) οστεοκαλσίνης στον ορού ή πλάσματος EDTA. Η άθικτη οστεοκαλσίνη είναι ένας χρήσιμος βιοχημικός δείκτης της ανακύκλωσης των οστών.

Η οστεοκαλσίνη (OC) ή BGP (οστική πρωτεΐνη gla) βρίσκεται αποκλειστικά στα οστά. Πρόκειται για εξωηπατική, εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 5800 που παράγεται από τους οστεοβλάστες. Περιέχει τρία κατάλοιπα γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη δέσμευση των ιόντων ασβεστίου και του υδροξυαπατίτη. Αποτελεί το 10–20% της μη κολλαγόνου πρωτεΐνης των οστών. Ενώ η *in vivo* λειτουργία της οστεοκαλσίνης παραμένει άγνωστη, η συγγένειά της προς τα μεταλλικά συστατικά των οστών υποδεικνύει κάποιο ρόλο στο σχηματισμό τους.

Η οστεοκαλσίνη αποτελεί περίπου το 10 έως 20% των οστικών πρωτεϊνών που δεν προέρχονται από το κολλαγόνο. Ο ανοσοπροσδιορισμός MicroVue της Οστεοκαλσίνης χρησιμοποιείται για ποσοτική μέτρηση της άθικτης (*de novo*) οστεοκαλσίνης στον ορό. Η άθικτη οστεοκαλσίνη είναι ένας χρήσιμος βιοχημικός δείκτης της ανακύκλωσης των οστών. Ενώ η *in vivo* λειτουργία της οστεοκαλσίνης παραμένει άγνωστη, η συγγένειά της προς τα μεταλλικά συστατικά των οστών υποδεικνύει κάποιο ρόλο στο σχηματισμό τους. Αυξημένα επίπεδα οστεοκαλσίνης έχουν διαπιστωθεί σε διάφορες νόσους, μεταξύ των οποίων η οστεομαλάκυνση, η νόσος Paget των οστών, υπερπαραθυρεοειδισμός, πρωτογενής υπερπαραθυρεοειδισμός και νεφρική οστεοδυστροφία. Τα επίπεδα οστεοκαλσίνης μπορούν επίσης να παρουσιάζονται αυξημένα στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση εξαιτίας αυξημένης ή μειωμένης οστικής εναλλαγής (turnover). Μειωμένα επίπεδα οστεοκαλσίνης έχουν διαπιστωθεί σε υποπαραθυρεοειδισμό και κατά τη διάρκεια μακρόχρονης θεραπείας με κορτικοστεροειδή.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση MicroVue Osteocalcin είναι ένας ανταγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός. Η ανάλυση χρησιμοποιεί λωρίδες επικαλυμμένες με οστεοκαλσίνη, αντίσωμα ποντικού έναντι της οστεοκαλσίνης, σύζευγμα αλκαλικής φωσφατάσης έναντι IgG αντισώματος ποντικού και υπόστρωμα pNPP για τον ποσοτικό υπολογισμό της οστεοκαλσίνης στον ορό ή πλάσμα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

96 Αναλύσεις για Οστεοκαλσίνη

Το kit MicroVue Osteocalcin EIA περιέχει τα παρακάτω:

- A** Τυπικά Οστεοκαλσίνης: Μέρη 4168-4173 1 από έναστο των
- B** Πρότυπα Διαλύματα A-F, λυοφιλοποιημένα, βλέπε
- C** Πιστοποιητικό Ανάλυσης για για συγκεντρώσεις
- D** Λυοφιλιωμένη οστεοκαλσίνη, απομονωμένη από ανθρώπινα οστά
- E** που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων και σταθεροποιητές
- F**

- L Χαμηλοί Μαρτυρες** **Μέρη 4174** **1 έकाστη**
Λυοφιλιωμένη οστεοκαλσίνη, απομονωμένη από ανθρώπινα οστά που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων και σταθεροποιητές
- H Υψηλοί Μαρτυρες** **Μέρη 4175** **1 έκαστη**
Λυοφιλιωμένη οστεοκαλσίνη, απομονωμένη από ανθρώπινα οστά που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων και σταθεροποιητές
- 1 Coated Strips (Επικαλυμμένες Λωρίδες)** **Μέρος) 4670** **12 έκαστη**
Οστεοκαλσίνη απομονωμένη από ανθρώπινα οστά που έχει απορροφηθεί στα πηγαδάκια σε λωρίδες
- 2 Stop Solution (Διάλυμα Παύσης)** **Μέρος 4702** **15 mL**
NaOH 0,5N
- 3 Διάλυμα Πλύσης 10X** **Μέρος 4703** **55 mL**
Μη ιοντικό καθαριστικό σε ρυθμισμένο διάλυμα που περιέχει νατραζίδιο (0,05%) ως συντηρητικό
- 4 Αντί-Οστεοκαλσίνη** **Μέρος 4089** **15 mL**
Απομονωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού αντί-οστεοκαλσίνης σε ρυθμισμένο διάλυμα που περιέχει μη ιοντικό καθαριστικό, σταθεροποιητές και νατραζίδιο (0,05%) ως συντηρητικό
- 5 Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος** **Μέρος 4705** **3 x 10 mL**
Διάλυμα διαιθανολαμίνης και χλωριούχου μαγνησίου που περιέχει νατραζίδιο (0,05%) ως συντηρητικό
- 6 Δισκία Υποστρώματος** **Μέρος 0012** **3 x 20 mg**
p-Νιτροφαίνυλο φωσφορικό
- 7 Σύζευγμα Ενζύμου** **Μέρος 4180** **3 έκαστη**
Λυοφιλιωμένο αντίσωμα αίγας έναντι IgG αντισώματος ποντικού συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση που περιέχει ρυθμιστικά άλατα και σταθεροποιητές

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Μικροπιπέττες για τη χορήγηση 25–300 µL και 500 µL
- Υλικά κατάλληλα για μέτρηση υγρών όγκου 10–300 mL
- Δοχείο για αραίωση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Συσκευή ανάγνωσης πλάκας με δυνατότητα ανάγνωσης στα 405 nm
- λογισμικό για δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης με προσέγγιση 4-παραμέτρων

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Για ερευνητική χρήση μόνον στις ΗΠΑ. Δεν προορίζεται για χρήση σε διαγνωστικές διαδικασίες (ΗΠΑ μόνον).
- Χειριστείτε τα δείγματα ως δυνητικά επικίνδυνο βιολογικό υλικό. Ακολουθήστε τις Γενικές Προφυλάξεις, όταν χειρίζεστε τα περιεχόμενα αυτού του kit και δείγματα ασθενών.
- Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ιματισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου όταν χειρίζεστε τα περιεχόμενα αυτού του kit.
- Χρησιμοποιήστε τα παρεχόμενα αντιδραστήρια ως ενιαίο σύνολο πριν από την ημερομηνία λήξης, που αναγράφεται στην ετικέτα της συσκευασίας.
- Φυλάξτε τα αντιδραστήρια ανάλυσης κατά τις υποδείξεις.
- Μην χρησιμοποιείτε τις Επικαλυμμένες Λωρίδες, αν το σακουλάκι είναι διάτρητο.

- Το Διάλυμα Παύσης θεωρείται διαβρωτικό και μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα. Μην το καταπίνετε. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια ή τα ρούχα. Αν η επαφή ήταν αναπόφευκτη, πλύνετε με νερό. Αν το καταπιείτε, καλέστε γιατρό.
- Το νατραζίδιο χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Η τυχαία επαφή ή κατάποση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν νατραζίδιο μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα, στα μάτια ή στο στόμα. Χρησιμοποιήστε τα ρυθμιστικά αυτά διαλύματα μόνο για τους σκοπούς για τους οποίους προορίζονται και αποφύγετε την επαφή με οξέα. Το νατραζίδιο μπορεί να αντιδράσει με τις μολύβδινες ή χάλκινες υδραυλικές σωληνώσεις και να σχηματίσει αζίδια μετάλλου ιδιαίτερα εκρηκτικά. Όταν το απορρίψετε, ξεπλύνετε με άφθονο νερό για να αποτρέψετε τον σχηματισμό αζιδίων.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος περιέχει διαιθανολαμίνη και ενδέχεται να προκαλεί ερεθισμό στα μάτια ή/και στο δέρμα μετά από παρατεταμένη επαφή. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ιματισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου. Οι περιοχές που έχουν προσβληθεί πρέπει να πλένονται αμέσως με σαπούνι και νερό.
- Συνιστάται η χρήση πολυκαναλικών ή επαναληπτικών πιπετών για την εξασφάλιση έγκαιρης χορήγησης αντιδραστηρίων.
- Για την ακριβή μέτρηση δειγμάτων, προσθέστε με ακρίβεια δείγματα και πρότυπα. Λάβετε με πιπέττα χρησιμοποιώντας μόνο βαθμονομημένα όργανα.
- Ελέγξτε κάθε δείγμα εις διπλούν.
- Μην χρησιμοποιείτε ένα πηγαδάκι μικροανάλυσης για περισσότερες από μία εξετάσεις.
- Η χρήση χρόνων επώασης και θερμοκρασιών διαφορετικών από εκείνες που υποδεικνύονται στην ενότητα ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ενδέχεται να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα.
- Πραγματοποιήστε την Επώαση Δείγματος/Αντί-Οστεοκαλσίνης στην ίδια θερμοκρασία κάθε φορά που εκτελείτε την ανάλυση (εντός ± 1 °C). Αν δεν μπορεί να υπάρξει σταθερή θερμοκρασία στο δωμάτιο, συνιστάται η χρήση συσκευής επώασης.
- Μην αφήνετε τα πηγαδάκια μικροανάλυσης να στεγνώσουν όταν έχει ξεκινήσει η ανάλυση.
- Όταν αφαιρείτε υγρό από τα πηγαδάκια μικροανάλυσης, μην αποξέετε ή αγγίζετε τον πυθμένα των φρεατίων.
- Είναι σημαντικό να υπάρχει επαρκής όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Στα βήματα της πλύσης, χορηγήστε με την πιπέττα τουλάχιστον 300 µL ανά πηγαδάκι. Πραγματοποιήστε την ανάλυση αυτή με οποιαδήποτε επικυρωμένη μέθοδο πλυσίματος.
- Απαλλαγείτε από τα δοχεία και τα μη χρησιμοποιημένα περιεχόμενά τους σύμφωνα με τους ομοσπονδιακούς, κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Όλα τα αντιδραστήρια πριν τη χρήση πρέπει να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία 20–25°C.

Coated Strips (Επικαλυμμένες Λωρίδες)

Αφαιρέστε το Πλαίσιο με τα Πηγαδάκια σε Λωρίδες και τον απαιτούμενο αριθμό Επικαλυμμένων Λωρίδων από το σακουλάκι (βλ. πίνακα στην ενότητα ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ). Βεβαιωθείτε ότι το σακουλάκι που περιέχει τυχόν μη χρησιμοποιημένες λωρίδες είναι πλήρως σφραγισμένο.

(Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης)

Προετοιμάστε το απαιτούμενο ποσό Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X (βλ. πίνακα) αραιώνοντας Διάλυμα Πλύσης 10X με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Αποθηκεύστε στους 18–28°C. Χρησιμοποιήστε το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X εντός 21 ημερών από την προετοιμασία του.

Σύζευγμα Ενζύμου

Παρασκευάστε Σύζευγμα Ενζύμου εντός 2 ωρών πριν από την χρήση. Ανασυστήστε κάθε απαιτούμενο φιαλίδιο Σύζευγματος Ενζύμου (βλ. πίνακα) με 10 mL Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X. Αφήστε το δισκίο να διαλυθεί πλήρως.

Πρότυπα και Μάρτυρες Οστεοκαλσίνης

Εντός 1 ώρας χρήσης, ανασυστήστε τα Πρότυπα και τους Μάρτυρες με 0,5 mL από το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X. Για την πλήρη διάλυση του δισκίου αφήστε το τουλάχιστον 15 λεπτά. Τα Πρότυπα και Μάρτυρες που προέρχονται από ανασύσταση δεν πρέπει να παραμείνουν στους 20–25°C για περισσότερο από 2 ώρες. Καταψύξτε στους -20°C όση ποσότητα Προτύπων και Μαρτύρων παραμείνει αχρησιμοποίητη. Μην καταψύχετε/αποψύχετε περισσότερες από 4 φορές.

Διάλυμα Εργασίας Υποστρώματος

Προετοιμάστε Διάλυμα Εργασίας Υποστρώματος εντός 1 ώρας πριν από τη χρήση του. Τοποθετήστε ένα Δισκίο Υποστρώματος σε κάθε απαιτούμενη φιάλη με Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος στους 20–25°C (βλ. πίνακα). Αφήστε το (τα) δισκίο(-α) 30–60 λεπτά για να διαλυθούν. Ανακινήστε έντονα τη φιάλη (τις φιάλες) για να αναμιχθούν πλήρως. Απορρίψτε το υπόλοιπο Διάλυμα Υποστρώματος Εργασίας μετά τη χρήση.

ΦΥΛΑΞΗ

Φυλάξτε το κιτ στους 2–8°C.

Φυλάξτε στους 2–8°C όσα αντιδραστήρια δεν χρησιμοποιηθούν.

Φυλάξτε το Ρυθμιστικό Πλύσης 1X (αραιωμένο από το 10X) στους 18–28°C.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ Ή ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Θολερότητα, αποχρωματισμός ή έντονη οσμή ίσως αποτελεί ένδειξη αστάθειας ή αποσύνθεσης του κιτ των αντιδραστηρίων. Αν συμβεί αυτό, απορρίψτε το αντιδραστήριο.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Έχει αναφερθεί ότι η οστεοκαλσίνη στον ορού ή πλάσματος EDTA είναι ευαίσθητη στην πρωτεόλυση. Προτείνεται το αίμα να διατηρείται στους 2–8°C αμέσως μετά τη συλλογή του και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Ο ορός πρέπει να επεξεργάζεται και να καταψύχεται στους $\leq -20^\circ\text{C}$ εντός 4 ωρών από τη συλλογή του. Αν η συλλογή και η επεξεργασία πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ο ορός πρέπει να υποστεί επεξεργασία και να εξεταστεί ή να καταψυχθεί ($\leq -20^\circ\text{C}$) εντός 2 ωρών από τη συλλογή του. Ο ορός πρέπει να καταψυχθεί στους $\leq -70^\circ\text{C}$ για φύλαξη μεγαλύτερη από ένα μήνα.

Αποψύξτε γρήγορα τα δείγματα ($\leq -70^\circ\text{C}$) σε υδατόλουτρο των 37°C μόλις μέχρι να αποψυχθούν. Μεταφέρετε τα αποψυγμένα δείγματα αμέσως σε πάγο (όχι για περισσότερο από τέσσερις ώρες). **Μην αφήσετε τα δείγματα στους 37°C.** Μην αποψύξετε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. Κατεψυγμένα δείγματα πρέπει να εξετάζονται όσο το δυνατό συντομότερα αφού αποψυχθούν. Επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη δε συνιστάται. Αν τα δείγματα χρειάζεται να επανακαταψυχθούν για περαιτέρω ανάλυση, η Quidel προτείνει την κατάψυξη πολλαπλών μεριδίων του δείγματος (aliquots) ώστε να αποφύγετε επαναλαμβανόμενους κύκλους κατάψυξης/ απόψυξης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Πριν ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε ολόκληρο το ένθετο του προϊόντος.

Προετοιμασία των Αντιδραστηρίων και των Υλικών Καθορίστε την ποσότητα κάθε αντιδραστηρίου που απαιτείται για τον αριθμό των λωρίδων που θα χρησιμοποιηθούν.

Αρ. Λωρίδων	4	6	8	12
Αρ. Δειγμάτων (έλεγχος εις διπλούν)	8	16	24	40
Σύζευγμα Ενζύμου (φιαλίδιο)	1	1	2*	2*
Υπόστρωμα (φιάλη)	1	1	2*	2*
Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X (mL)	100	150	200	300

* Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία φιάλες ή φιαλίδια, συνδυάστε τα περιεχόμενα και αναμίξτε πριν από τη χρήση.

Επώαση Δείγματος/Αντί-Οστεοκαλσίνης

1. Προετοιμάστε το απαιτούμενο ποσό Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X (βλ. πίνακα) αραιώνοντας Διάλυμα Πλύσης 10X με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Αποθηκεύστε στους 18–28°C. Χρησιμοποιήστε το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X εντός 21 ημερών από την προετοιμασία του.
2. Εντός 1 ώρας χρήσης, ανασυστήστε τα Πρότυπα και τους Μάρτυρες με 0,5 mL από το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X. Για την πλήρη διάλυση του δισκίου αφήστε το τουλάχιστον 15 λεπτά. Τα Πρότυπα και Μάρτυρες που προέρχονται από ανασύσταση δεν πρέπει να παραμείνουν στους 20–25°C για περισσότερο από 2 ώρες. Καταψύξτε στους -20°C όση ποσότητα Προτύπων και Μαρτύρων παραμείνει αχρησιμοποίητη. Μην καταψύχετε/αποψύχετε περισσότερες από 4 φορές.

3. Αφαιρέστε το Πλαίσιο από τα Πηγαδάκια των Λωρίδων και τον απαιτούμενο αριθμό Επικαλυμμένων Λωρίδων από το σακουλάκι (βλ. πίνακα). Βεβαιωθείτε ότι το σακουλάκι που περιέχει τυχόν μη χρησιμοποιημένες λωρίδες είναι πλήρως σφραγισμένο.
4. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό Επικαλυμμένων Λωρίδων στο Πλαίσιο με τα Πηγαδάκια σε Λωρίδες λίγο πριν τις χρησιμοποιήσετε. Σημάνετε τις λωρίδες για να αποτρέψετε τυχόν μπερδέματα σε περίπτωση μη ηθελημένης αφαίρεσης από το Πλαίσιο με τα Πηγαδάκια σε Λωρίδες.
5. Προσθέστε 25 μL Προτύπου, Μάρτυρα ή δείγματος σε κάθε πηγαδάκι των Επικαλυμμένων Λωρίδων. Το βήμα αυτό πρέπει να έχει ολοκληρωθεί εντός 30 λεπτών.
6. Προσθέστε 125 μL Αντί-Οστεοκαλσίνης σε κάθε πηγαδάκι και επώαστε για 2 ώρες (\pm 10 λεπτά) στους 20–25°C.
7. Ενώ επωάζετε, παρασκευάστε Σύζευγμα Ενζύμου. Ανασυστήστε κάθε απαιτούμενο φιαλίδιο Σύζευγματος Ενζύμου (βλ. πίνακα) με 10 mL Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X. Αφήστε το δισκίο να διαλυθεί πλήρως. Χρησιμοποιήστε εντός 2 ωρών.

Βήμα Πλύσης (1)

8. Αναποδογυρίστε/αδειάστε χειροκίνητα τις λωρίδες. Προσθέστε τουλάχιστον 300 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X σε κάθε πηγαδάκι και αναποδογυρίστε/αδειάστε χειροκίνητα τις λωρίδες. Επαναλάβετε δύο ακόμα φορές, ώστε να επιτευχθεί ένα συνολικό ποσό τριών πλύσεων. Στεγνώστε καλά τις λωρίδες με χαρτοπετσέτες μετά την τελευταία πλύση.

Επώαση Συζεύγματος Ενζύμου

9. Προσθέστε 150 μL Συζεύγματος Ενζύμου που προέρχεται από ανασύσταση σε κάθε πηγαδάκι.
10. Επώαστε επί 60 λεπτά (\pm 5 λεπτά) στους 20–25°C.
11. Ενώ επωάζετε, παρασκευάστε Διάλυμα Εργασίας Υποστρώματος. Τοποθετήστε ένα Δισκίο Υποστρώματος σε κάθε απαιτούμενη φιάλη με Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος (βλ. πίνακα). Αφήστε το(α) δισκίο(α) 30–60 λεπτά για να διαλυθεί(ούν). Ανακινήστε καλά τη φιάλη (τις φιάλες) για να αναμιχθούν πλήρως. Χρησιμοποιήστε εντός μιας ώρας.

Βήμα Πλύσης (2)

12. Αναποδογυρίστε/αδειάστε χειροκίνητα τις λωρίδες. Προσθέστε τουλάχιστον 300 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος Πλύσης 1X σε κάθε πηγαδάκι και αναποδογυρίστε/αδειάστε χειροκίνητα τις λωρίδες. Επαναλάβετε δύο ακόμα φορές, ώστε να επιτευχθεί ένα συνολικό ποσό τριών πλύσεων. Στεγνώστε καλά τις λωρίδες με χαρτοπετσέτες μετά την τελευταία πλύση.

Επώαση Υποστρώματος

13. Προσθέστε 150 μL Διάλυμα Εργασίας Υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι.

14. Επώαστε επί 35–40 λεπτά στους 20–25°C. **Σημείωση:** Αν δεν μπορείτε να διατηρήσετε τη θερμοκρασία δωματίου στους 20–25°C, και η απορρόφηση > 2,0 δεν είναι συμβατή με τη συσκευή ανάγνωσης πλάκας, παρακολουθείστε την ανάπτυξη του υποστρώματος σε πηγαδάκια τύπου A. Σταματήστε την αντίδραση όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει τα 1,5. Στη συνέχεια, διαβάστε ξανά τις λωρίδες.

Παύση/Ανάγνωση

15. Προσθέστε 50 μL Διαλύματος Παύσης σε κάθε πηγαδάκι για να σταματήσετε την αντίδραση.
16. Διαβάστε την οπτική πυκνότητα στα 405 nm. Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες φυσαλίδες στα πηγαδάκια και ότι οι πυθμένες των λωρίδων είναι καθαροί. Διαβάστε τις λωρίδες εντός **15 λεπτών** από την προσθήκη Διαλύματος Παύσης.
17. Χρησιμοποιήστε για δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης με εξίσωση προσέγγισης 4-παραμέτρων για να αναλύσετε τα αποτελέσματα της ανάλυσης MicroVue Osteocalcin.
Εξίσωση: $y = (A-D)/(1+(x/C)^B) + D$
18. Προσδιορίστε τη συγκέντρωση δειγμάτων και Μαρτύρων από την πρότυπη καμπύλη. Αραιώστε τα δείγματα που έχουν συγκέντρωση μεγαλύτερη από 32 ng/mL με Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 1X και επαναλάβετε τη δοκιμή. Στον υπολογισμό να συμπεριλαμβάνεται ο παράγοντας διάλυσης. Οι τιμές των μαρτύρων πρέπει να βρίσκονται εντός του εύρους που καθορίζεται στο Πιστοποιητικό της Ανάλυσης που συνοδεύει το κιτ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Το Πιστοποιητικό Ανάλυσης που περιλαμβάνεται στο κιτ αυτό αναφέρεται στη συγκεκριμένη παρτίδα και χρησιμοποιείται για να επαληθεύσετε τη συμφωνία των αποτελεσμάτων που λάβατε στο εργαστήριό σας με εκείνα που λήφθηκαν από την Quidel Corporation. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας παρέχονται και πρέπει να χρησιμοποιηθούν μόνο ως κατευθυντήριες γραμμές. Τα αποτελέσματα που έλαβε το εργαστήριό σας μπορεί να διαφέρουν.

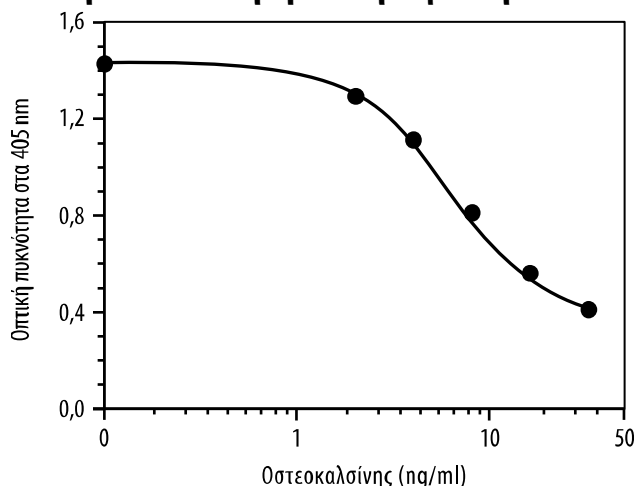
Παρέχονται διαστήματα ελέγχου ποιότητας. Οι τιμές-μάρτυρες προορίζονται για να επιβεβαιώσουν την εγκυρότητα της καμπύλης και των αποτελεσμάτων του δείγματος. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθιερώσει τις δικές του παραμέτρους για τα αποδεκτά όρια της ανάλυσης. Αν οι τιμές-μάρτυρες ΔΕΝ βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων του εργαστηρίου σας, τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να θεωρηθούν αμφισβητήσιμα και τα δείγματα να επαναληφθούν.

Αν η οπτική πυκνότητα του Προτύπου A του MicroVue Osteocalcin είναι μικρότερη από 0,8, τα αποτελέσματα πρέπει να θεωρούνται αμφισβητήσιμα, και τα δείγματα να επαναλαμβάνονται.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ng/mL και **δεν** χρειάζεται να διορθωθούν για την αραιώση (εκτός αν το δείγμα αραιώθηκε πριν από την εξέταση)

Αντιπροσωπευτική Πρότυπη Καμπύλη



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΙΜΩΝ

Κατά τη δοκιμή που πραγματοποιήσαμε σε 140 ενήλικους άνω των 25 ετών, οι τιμές που λήφθηκαν από το MicroVue Osteocalcin kit κυμάνθηκαν μεταξύ 3,7-10,0 ng/mL.

Οι τιμές μπορεί να επηρεάζονται από παράγοντες, όπως η χαμηλή παραγωγή οιστρογόνων, η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου ή η περιορισμένη σωματική δραστηριότητα. Η ανεπάρκεια οιστρογόνων στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανακύκλωση των οστών. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίσει το δικό του διάστημα φυσιολογικών τιμών αναφοράς.

Η ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η Ειδικότητα του Αντισώματος

Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της οστεοκαλσίνης δημιουργήθηκε έναντι της βοείου Οστεοκαλσίνης, η οποία είναι σημαντικά ομόλογη με την ανθρώπινη οστεοκαλσίνη. Το αντίσωμα πιστεύεται να είναι εξαρτώμενο από τη διαμόρφωση και γι' αυτό αναγνωρίζει μόνο την άθικτη (de novo) οστεοκαλσίνη και όχι θραύσματα από επαναπροσροφώμενα οστά.

	% Δραστικότητα
Άθικτη ανθρώπινη οστεοκαλσίνη	100
Άθικτη βόεια οστεοκαλσίνη	100
Ανοιγμένη, αλκυλιωμένη οστεοκαλσίνη	ΔΑ
Θραύσμα C-άκρου οστεοκαλσίνης	ΔΑ
Θραύσμα N-άκρου οστεοκαλσίνης	ΔΑ

ΔΑ = δεν ανιχνεύθηκε

Όρια Ανίχνευσης

Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ανάλυσης του MicroVue Osteocalcin Assay είναι 0,45 ng/mL, όπως καθορίζεται από το ανώτερο όριο 3 SD σε μελέτη μηδενικών προτύπων (zero standard).

Ακρίβεια

Η ακρίβεια εντός κύκλου και μεταξύ κύκλων ορίστηκε μέσα από την εκτίμηση τριών δειγμάτων ορού. Παρατίθενται ορισμένα χαρακτηριστικά αποτελέσματα.

Οστεοκαλσίνη (ng/mL)	Εντός κύκλου ¹ C.V. (%)	Μεταξύ κύκλων ² C.V. (%)
6,2	10,0	9,8
7,4	4,8	4,8
16,5	8,0	7,6

¹ n = 22 επαναλήψεις

² n = 3 σε 3 κύκλους

ΒΟΗΘΕΙΑ

Για υπηρεσίες εκτός ΗΠΑ, επικοινωνήστε με τον τοπικό διανομέα. Πρόσθετες πληροφορίες για την Quidel, τα προϊόντα μας και τους αντιπροσώπους μας μπορούν να βρεθούν στον ιστοχώρο μας www.quidel.com.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Banfi G, Daverio R. In vitro stability of osteocalcin. *Clin. Chem.* 1994;40:833-834.
2. Blumsohn A, Hannon RA, Eastell R. Apparent instability of osteocalcin in serum as measured with different commercially available immunoassays. *Clin. Chem.* 1995;41:318-319.
3. Delmas PD. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In: Riggs BL, Melton LJ, III (eds): *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995, pp. 319-333.
4. Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone gla-protein. *J. Lab. Clin. Med.* 1983;102:470-476.
5. Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA, Peterson JM, Mann KG, Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone gla protein and bone alkaline phosphatase: Effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988;66:951-957.
6. Gomez B, Bally CA, Jenkins DK, Kelm RJ, Jr., Seyedin S. An enzyme immunoassay for intact, newly synthesized osteocalcin: A marker of bone formation. *International Conference on Progress in Bone and Mineral Research*, Vienna, Austria, October 14-16 1994. (abst)
7. Ismail F, Epstein S, Pacifici R, Droke D, Thomas SB, Avioli LV. Serum bone gla protein (BGP) and other markers of bone mineral metabolism in postmenopausal osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* 1986;39:230-233.
8. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ, Nishimoto SK. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J. Clin. Invest.* 1980;66:878-883.
9. Riggs BL, Mann KG. Assessment of metabolic bone diseases by measurement of serum bone gla-protein. In: Sen A, Thornhill T (eds): *Development of diseases of cartilage and bone matrix*. New York: Alan R Liss, 1987, pp. 177-186.
10. Tracy RP, Andrianorivo A, Riggs BL, Mann KG. Comparison of monoclonal and polyclonal antibody-based immunoassays for osteocalcin: A study of sources of variation in assay results. *J. Bone Miner. Res.* 1990;5(5):451-461.
11. Triffitt JT. The Special Proteins of Bone Tissue. *Clin. Sci.* 1987;72:399-408.
12. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης στο CDROM

REF 8002 – **MICROVUE** Bone Health Osteocalcin EIA Kit



RESEARCH TO RAPIDS®

Quidel Corporation | 10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA | www.quidel.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany