



QUIDEL

MicroVue™ Bone

Osteocalcin EIA

Um imunoenensaio enzimático para a quantificação da osteocalcina intacta em plasma o soro

SUMÁRIO

Preparação do Reagent e da Amostra

- Preparar o tampão de lavagem 1X (*Diluir o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada*)
- Reconstituir os Padrões e Controlos com 0,5 ml de tampão de lavagem 1X (*Os não devem permanecer entre 20°C a 25°C durante mais do que 2 horas*)

Procedimento de Ensaio

Adicionar **25 µl** de Padrão, Controlo ou amostra a cada poço das tiras revestidas

Adicionar **125 µl** de anti-osteocalcina em cada poço

Incubar durante **2 horas (± 10 minutos)** entre 20°C a 25°C

- Preparar o conjugado enzimático com tampão de lavagem (*Adicionar 10 ml de tampão de lavagem 1X para cada frasco necessário de conjugado*) *Deixar que o pellet dissolva completamente.*

Lavar **3X** com Tampão de Lavagem 1X

Adicionar **150 µl** de conjugado enzimático reconstituído a cada poço

Incubar durante **60 minutos (± 5 minutos)** entre 20°C a 25°C

- Preparar a solução de substrato de trabalho (*30 a 60 minutos antes do uso*) *Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário (Agitar vigorosamente)*

Lavar **3X** com Tampão de Lavagem 1X

Adicionar **150 µl** de solução de substrato de trabalho em cada poço

Incubar durante **35 a 40 minutos** entre 20°C a 25°C

Adicionar **50 µl** de solução de paragem a cada poço

Ler a densidade óptica a 405 nm. Analise os resultados de ensaio usando um ajuste da curva de quatro parâmetros
 $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$



FINALIDADE

O imunoenensaio MicroVue Osteocalcin mede quantitativamente a osteocalcina intacta (*de novo*) no soro o plasma EDTA. A osteocalcina intacta poderá ser útil como indicador bioquímico de renovação óssea

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A osteocalcina (OC) ou BGP (proteína óssea gla) é encontrada exclusivamente em tecido ósseo. Trata-se de uma proteína extra-hepática dependente da vitamina K com 5800 de peso molecular produzida por osteoblastos. Contém três resíduos do ácido gama-carboxiglutâmico que se pensa estar envolvido na fixação de iões de cálcio e hidroxapatite. É responsável por 10 a 20 % da proteína não colagénica no osso. Embora se desconheça a função *in vivo* da osteocalcina, a sua afinidade pelos constituintes do mineral ósseo implica uma função na formação óssea.

A osteocalcina representa entre 10 a 20 % da proteína não colagénica no osso. O imunoenensaio MicroVue Osteocalcin mede quantitativamente a osteocalcina intacta (*de novo*) no soro. A osteocalcina intacta poderá ser útil como indicador bioquímico de renovação óssea. Embora se desconheça a função *in vivo* da osteocalcina, a sua afinidade pelos constituintes do mineral ósseo implica uma função na formação óssea. Têm sido demonstrados níveis elevados de osteocalcina em diferentes patologias, incluindo a osteomalacia, a doença óssea de Paget, o hipertiroidismo, o hiperparatiroidismo primário e a osteodistrofia renal. Os níveis de osteocalcina podem também ser elevados com a osteoporose pós-menopausa devido a renovação óssea aumentada ou reduzida. Têm sido referidos níveis baixos de osteocalcina com o hiperparatiroidismo e durante terapêuticas com corticosteróides de longa acção.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O ensaio MicroVue Osteocalcin é um imunoenensaio competitivo. Para o ensaio são utilizadas tiras revestidas de osteocalcina, um anticorpo anti-osteocalcina de rato, um conjugado com fosfatase alcalina (IgG) anti-rato e um substrato pNPP para quantificar a osteocalcina no plasma o soro.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 ensaios para a osteocalcina

O MicroVue Osteocalcin EIA kit contém o seguinte:

A	Padrões de osteocalcina	Referências 4168 – 4173	1 cada
B	Calibradores A-F, liofilizados, consultar concentrações no Certificado de análise		
C	Osteocalcina liofilizada purificada proveniente de osso humano, contendo sais tampão e		
D	estabilizadores		
E			
F			
L	Controlos baixos	Referências 4174	1 de cada
	Osteocalcina liofilizada purificada proveniente de osso humano, contendo sais tampão e		
	estabilizadores		
H	Controlos altos	Referências 4175	1 de cada
	Osteocalcina liofilizada purificada proveniente de osso humano, contendo sais tampão e		
	estabilizadores		
1	Tiras revestidas	Referência 4670	12 de cada
	Osteocalcina purificada proveniente de osso humano absorvida em tiras de poços		
2	Solução de paragem	Referência 4702	15 ml
	NaOH 0,5 N		

3	Tampão de lavagem 10X Detergente não-iónico numa solução tamponada contendo azida de sódio (0,05 %) como conservante	Referência 4703	55 ml
4	Anti-osteocalcina Anticorpo anti-osteocalcina monoclonal murínico purificado numa solução tamponada contendo detergente não-iónico, estabilizadores e azida de sódio (0,05 %) como conservante	Referência 4089	15 ml
5	Tampão de substrato Uma solução de dietanolamina e cloreto de magnésio contendo azida de sódio (0,05 %) como conservante	Referência 4705	3 x 10 ml
6	Comprimidos de substrato p-nitrofenil fosfato	Referência 0012	3 x 20 mg
7	Conjugado enzimático Anticorpo IgG anti-rato de cabra liofilizado conjugado com fosfatase alcalina contendo sais tampão e estabilizadores	Referência 4180	3 de cada

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas para distribuição de 25 a 300 µl e 500 µl
- Itens adequados para a medição de 10 a 300 ml de líquido
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Garrafa de tampão de lavagem
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade de leitura a 405 nm
- Software adequado a uma regressão da curva de calibração de 4 parâmetros

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Apenas para fins de investigação nos EUA. Não se destina à utilização em procedimentos de diagnóstico (apenas nos EUA).
- Tratar as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.
- Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
- Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
- Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
- O solução de paragem é considerado corrosivo e pode provocar irritação na pele. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
- A azida de sódio é utilizada como conservante. O contacto ou ingestão acidental de tampões com azida de sódio pode provocar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Utilizar os tampões apenas para os fins previstos e evitar o contacto com ácidos. A azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Aquando da sua eliminação, deixar correr muita água de modo a evitar uma acumulação deste produto.
- O tampão de substrato contém dietanolamina e poderá provocar irritação nos olhos e/ou pele em caso de contacto prolongado. As zonas que tenham estado em contacto com este produto deverão ser imediatamente lavadas com água e sabão.
- Para assegurar o fornecimento atempado dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
- Para uma medição precisa de amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado recorrendo apenas a equipamento calibrado.
- Analisar cada amostra em duplicado.
- Não usar um poço de microensaio para mais do que um teste.

- A utilização de tempos ou temperaturas de incubação diferentes dos especificados na secção *PROCEDIMENTO DE ENSAIO* pode originar resultados erróneos.
- Proceder à incubação da amostra/anti-osteocalcina à mesma temperatura, sempre que for efectuado o ensaio (± 1 °C). Se não for possível manter uma temperatura ambiente constante, recomenda-se a utilização de um incubador.
- Não permitir que os poços do microensaio sequem depois de iniciar o ensaio.
- Ao remover líquido dos poços do microensaio, não raspar nem tocar no fundo dos poços.
- É importante a utilização de um volume de tampão de lavagem adequado; dispense, pelo menos, 300 μ l por poço nos passos de lavagem. Efectuar este ensaio com qualquer método de lavagem validado. Para obter melhores resultados, não utilize uma pipeta multicanal para lavar a placa.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- Elimine os recipientes e conteúdo não utilizado de acordo com federais, estatais e requisitos regulamentares locais.
- Usar vestuário adequado, luvas e protecção de rosto e olhos sempre que manusear o conteúdo deste kit.
- Lave bem as mãos após o manuseamento.
- Para obter informações adicionais sobre os símbolos de perigo, segurança, o manuseamento e a eliminação dos componentes contidos neste kit, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível em quidel.com.

ARMAZENAMENTO

Armazenar o kit entre 2°C a 8°C. Armazenar os reagentes não utilizados entre 2°C a 8°C. Conservar o tampão de lavagem 1X (10X diluído) entre 18°C a 28°C.

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

Turvação, descoloração ou odor desagradável poderão indicar instabilidade ou a deterioração dos reagentes do kit. Se isto acontecer, eliminar o reagente.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Foi referido que a osteocalcina no soro o plasma EDTA é sensível a proteólise. O sangue deverá ser conservado entre 2°C a 8°C imediatamente após a colheita e durante o respectivo processamento. O soro deverá ser processado e congelado a $\leq -20^\circ\text{C}$, no prazo de 4 horas após a colheita. Se a colheita e o processamento forem realizados à temperatura ambiente, o soro deverá ser processado e testado ou congelado ($\leq -20^\circ\text{C}$) no prazo de 2 horas após a colheita. O soro deverá ser congelado a $\leq -70^\circ\text{C}$ para um armazenamento superior a um mês.

Descongelar as amostras congeladas ($\leq -70^\circ\text{C}$) rapidamente a 37°C até descongelarem apenas. Transferir as amostras descongeladas imediatamente para gelo (durante um período não superior a quatro horas). **Não deixar as amostras a 37°C.** Não descongelar amostras à temperatura ambiente ou 4°C. As amostras devem ser testadas o mais rápido possível após a descongelação. A congelação e descongelação repetidas são desaconselhadas. Se for necessário recongelar as amostras para posterior análise, a Quidel sugere a congelação de várias alíquotas da amostra para evitar ciclos múltiplos de congelação/dcongelação.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes devem ser compensados entre 20°C a 25°C antes de serem utilizados

Tiras revestidas

Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro na secção *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.

Tampão de lavagem

Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro), diluindo o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 18°C a 28°C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nos 21 dias seguintes à preparação.

Conjugado enzimático

Preparar o conjugado enzimático 2 horas antes da sua utilização. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 10 ml de tampão de lavagem 1X. Deixar que o pellet dissolva completamente.

Padrões e controlos de osteocalcina

1 hora após a utilização, reconstituir os Padrões e Controlos com 0,5 ml de tampão de lavagem 1X. Deixar passar, pelo menos, 15 minutos para que o pellet se dissolva completamente. Os Padrões e Controlos reconstituídos não devem permanecer entre 20°C a 25°C durante mais do que 2 horas. Congelar a porção não utilizada de Padrões e Controlos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Não congelar/descongelar mais do que 4 vezes.

Solução de substrato de trabalho

Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário entre 20°C a 25°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente. Eliminar a solução de substrato de trabalho restante após a utilização.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Ler o folheto informativo completo antes de iniciar o ensaio.

Determinar a quantidade necessária de cada reagente para o número de tiras que vão ser utilizadas.

N.º de tiras	4	6	8	12
N.º de amostras (analisadas em duplicado)	8	16	24	40
Conjugado enzimático (frasco)	1	1	2*	2*
Substrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampão de lavagem 1X (ml)	100	150	200	300

*Se se for utilizar mais do que um frasco, combinar o conteúdo e misturar antes de utilizar.

Incubação da amostra/anti-osteocalcina

1. Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro), diluindo o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 18°C a 28°C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nos 21 dias seguintes à preparação.
2. 1 hora após a utilização, reconstituir os Padrões e Controlos com 0,5 ml de tampão de lavagem 1X. Deixar passar, pelo menos, 15 minutos para que o pellet se dissolva completamente. Os Padrões e Controlos reconstituídos não devem permanecer entre 20°C a 25°C durante mais do que 2 horas. Congelar a porção não utilizada de Padrões e Controlos a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Não congelar/descongelar mais do que 4 vezes.
3. Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.
4. Colocar o número pretendido de tiras revestidas na armação das tiras de poços antes de utilizar. Rotular as tiras para evitar que se misturem em caso de remoção acidental da armação das tiras de poços.
5. Adicionar 25 μL de Padrão, Controlo ou amostra a cada poço das tiras revestidas. Este passo deverá estar concluído em 30 minutos.

6. Adicionar 125 µL de anti-osteocalcina em cada poço e incubar durante 2 horas (± 10 minutos) entre 20°C a 25°C.
7. Durante a incubação, preparar o conjugado enzimático. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 10 ml de tampão de lavagem 1X. Deixar que o pellet dissolva completamente. Usar no prazo de 2 horas.

Fase de lavagem (1)

8. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 300 µL de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as bem sobre toalhas de papel após a última lavagem.

Incubação do conjugado enzimático

9. Adicionar 150 µL de conjugado enzimático reconstituído a cada poço.
10. Incubar durante 60 minutos (± 5 minutos) entre 20°C a 25°C.
11. Durante a incubação, preparar a solução de substrato de trabalho. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente. Usar no prazo de uma hora.

Fase de lavagem (2)

12. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 300 µL de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as bem sobre toalhas de papel após a última lavagem.

Incubação do substrato

13. Adicionar 150 µL de solução de substrato de trabalho em cada poço.
14. Incubar durante 35 a 40 minutos entre 20°C a 25°C.

NOTA: Se não for possível manter a temperatura entre 20°C a 25°C e se uma absorvência > 2,0 não for compatível com o leitor de placas, monitorizar o desenvolvimento do substrato nos poços de Padrão A; parar a reacção quando a densidade óptica atingir 1,5; de seguida, proceder à leitura das tiras.

Parar/Ler

15. Adicionar 50 µL de solução de paragem a cada poço para parar a reacção.
16. Ler a densidade óptica a 405 nm. Assegurar que não existem bolhas de grandes dimensões nos poços e que o fundo das tiras está limpo. Ler as tiras **15 minutos** depois da adição da solução de paragem.
17. Utilizar software de quantificação com uma equação de regressão adequada a uma curva de calibração de 4 parâmetros para analisar os resultados do ensaio MicroVue Osteocalcin.

$$\text{Equação: } y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$$

18. Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão. Diluir as amostras superiores a 32 ng/ml em tampão de lavagem 1X e analisar novamente. Incluir o factor de diluição no cálculo. Os valores de controlo devem estar dentro dos limites especificados no Certificado de Análise fornecido com o kit.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos pelo seu laboratório são semelhantes aos obtidos na Quidel Corporation. Os valores da densidade óptica são fornecidos e devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

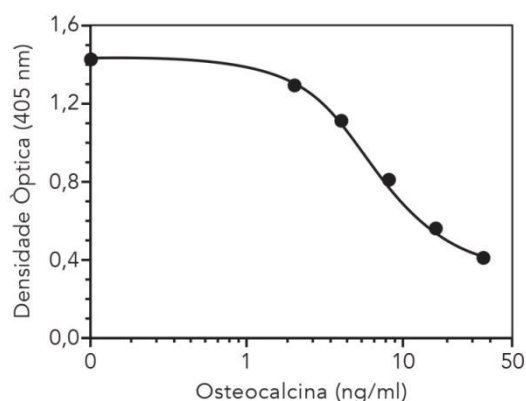
São fornecidos intervalos para o controlo de qualidade. Os valores de controlo destinam-se a verificar a validade da curva e os resultados das amostras. Cada laboratório deve definir os seus próprios parâmetros para os limites aceitáveis dos ensaios. Se os valores de controlo NÃO estiverem dentro dos limites de aceitação do laboratório, os resultados dos ensaios devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

Se a densidade óptica do MicroVue Osteocalcin Standard A for inferior a 0,8, os resultados devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados das amostras são expressos como ng/ml e **não** necessitam de ser corrigidos para a diluição (a menos que a amostra tenha sido diluída antes das análises).

Curva padrão representativa



VALORES EXEMPLIFICATIVOS

Em testes realizados a 140 adultos com mais de 25 anos de idade, os valores obtidos com o MicroVue Osteocalcin kit variavam entre 3,7 a 10,0 ng/ml.

Os valores podem ser influenciados por factores como a baixa produção de estrogénio, baixa ingestão de cálcio ou actividade física reduzida. A deficiência de estrogénio nas mulheres após a menopausa pode ter como resultado uma renovação óssea aumentada. Cada laboratório deve definir os seus próprios intervalos de referência normais.

DESEMPENHO DO TESTE

Especificidade do anticorpo

O anticorpo anti-osteocalcina monoclonal foi aumentado contra a osteocalcina bovina, que apresenta uma homologia significativa com a osteocalcina humana. Pensa-se que este anticorpo é conformemente dependente, devendo por isso reconhecer apenas a osteocalcina intacta (de novo) e não fragmentos de tecido ósseo reabsorvido.

	% Reactividade
Osteocalcina humana intacta	100
Osteocalcina bovina intacta	100
Osteocalcina alquilada reduzida	ND
Fragmento de osteocalcina C-terminal	ND
Fragmento de osteocalcina N-terminal	ND

ND = não detectado

Limites de detecção

O limite de detecção analítica mínimo do MicroVue Osteocalcin Assay é de 0,45 ng/ml, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de padrão zero.

Precisão

A precisão intra e entre ensaios foi determinada através da análise a três amostras de soro. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Osteocalcina (ng/ml)	Intra ensaios ¹ C.V.(%)	Entre ensaios ² C.V.(%)
6.2	10.0	9.8
7.4	4.8	4.8
16.5	8.0	7.6

¹n = 22 réplicas ²n = 3 em 3 ensaios

ASSISTÊNCIA

Para serviços fora dos EUA, contactar o distribuidor local. A informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em quidel.com.

REFERÊNCIAS

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, Pacifi ci 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.

REF 8002 – MicroVue Osteocalcin EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI8002000PT00 (10/17)

GLOSSÁRIO

REF

Número de catálogo



Marca CE de conformidade

EC REP

Representante autorizado na Comunidade Europeia

LOT

Número do lote



Utilizar até



Fabricante



Limitação de temperatura



Utilização prevista



Consulte as instruções e-rotulagem de utilização

IVD

Para diagnóstico *in vitro*



Contém o suficiente para 96 determinações

CONT

Conteúdo / Contem

CONTROL

Controlo
