

N-MID Osteocalcin

Osteocalcina (OCN)

12149133 122

100 testes

cobas

Português

Função

Imunoensaio para a determinação quantitativa in vitro da N-MID osteocalcina em soro e plasma humanos. A determinação é utilizada para o controlo da eficiência da terapêutica anti-ressorção, por exemplo, doentes com osteoporose ou hipercalemia. O imunoensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou "ECLIA") foi concebido para ser utilizado nos analisadores de imunoensaios Elecsys 1010/2010 e MODULAR ANALYTICS E170 (Módulo Elecsys) da Roche.

Características^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}

A osteocalcina, a proteína não colagénica mais importante da matriz óssea, é uma proteína de ligação de cálcio, específica do osso, que está dependente da vitamina K. Contém 49 aminoácidos e tem um peso molecular de aprox. 5800 daltons. Contém até três resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (bone-GLA-protein = BGP). Durante a síntese óssea, a osteocalcina é produzida pelos osteoblastos. A sua produção está dependente da vitamina K (formação de resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico) e é estimulada pela vitamina D3. Depois de libertada dos osteoblastos, a osteocalcina é não só assimilada pela matriz óssea, mas também segregada para a circulação sanguínea. Assim, o nível de osteocalcina sérica (plasmática) está relacionado com a reconstrução óssea em várias doenças do metabolismo ósseo, por exemplo, e em particular, na osteoporose, mas também no hiperparatiroidismo primário e secundário e na doença de Paget. A osteocalcina é, por conseguinte, denominada um marcador da reconstrução óssea e é utilizada para esse fim. Através da determinação da osteocalcina, é possível monitorizar a terapêutica com fármacos anti-ressorção (bifosfonatos ou terapêutica de substituição hormonal, TSH) em, por exemplo, doentes com osteoporose ou hipercalemia. A osteocalcina intacta (aminoácidos 1-49) e o fragmento N-MID de grandes dimensões (aminoácidos 1-43) ocorrem ambos no sangue. A osteocalcina intacta é instável, devido à clivagem da protease entre os aminoácidos 43 e 44. O fragmento N-MID resultante da clivagem é consideravelmente mais estável. O ensaio Elecsys N-MID Osteocalcin utiliza dois anticorpos monoclonais especificamente dirigidos contra os epítomos no fragmento N-MID e no fragmento N-terminal. Por conseguinte, o ensaio detecta o fragmento N-MID estável, assim como a osteocalcina (ainda) intacta. O teste não está dependente do fragmento terminal-C instável (aminoácidos 43-49) da molécula de osteocalcina e, por isso, assegura resultados de determinação constantes em condições de rotina no laboratório.

Princípio do teste

Técnica de sandwich. Duração total do ensaio: 18 minutos.

- 1ª incubação: 20 μ l de amostra, um anticorpo monoclonal biotilado específico da N-MID osteocalcina e um anticorpo monoclonal específico da N-MID osteocalcina marcado com complexo de ruténio^a reagem entre si e formam um complexo sandwich.
- 2ª incubação: Após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interacção da biotina e da estreptavidina.
- A mistura de reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, que é gerada especificamente pelo analisador por uma calibração de 2 pontos, e uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

a) Complexo Tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) (Ru(bpy)₃²⁺)

Reagentes - soluções de trabalho

Dispositivo de reagentes N-MID Osteocalcin, Ref. 12149133 - 100 testes

- M Micropartículas revestidas de estreptavidina (tampa transparente), 1 frasco, 6,5 ml;
Micropartículas revestidas de estreptavidina, 0,72 mg/ml, capacidade de fixação: 470 ng biotina/mg micropartículas; conservante.

- R1 Anticorpo anti-osteocalcina-N-MID~biotina (tampa cinzenta), 1 frasco, 10 ml;
Anticorpos monoclonais biotilados anti-N-MID osteocalcina (ratinho) 1,5 mg/l; tampão fosfato 100 mmol/l, pH 6,0; conservante.
- R2 Anticorpo anti-N-MID osteocalcina~Ru(bpy)₃²⁺ (tampa preta), 1 frasco, 10 ml;
Anticorpo monoclonal anti-N-MID osteocalcina (ratinho) marcado com complexo de ruténio 1,3 mg/l; tampão fosfato 100 mmol/l, pH 6,0; conservante.

Precauções e advertências

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Respeite as precauções normais de manuseamento de reagentes laboratoriais. Elimine todos os resíduos de acordo com os regulamentos locais. Ficha de segurança fornecida a pedido, para uso profissional.

Evite a formação de espuma com todos os reagentes e com todo o tipo de amostras (amostras de pacientes, calibradores e controlos).

Preparação dos reagentes

Os reagentes do dispositivo foram incluídos numa unidade pronta a ser utilizada que não pode ser separada.

Toda a informação necessária ao correcto funcionamento é introduzida no analisador através dos respectivos códigos de barras do reagente.

Conservação e estabilidade

Conservar a 2-8°C.

Coloque o dispositivo de reagentes Elecsys N-MID Osteocalcin **na vertical** para assegurar a total disponibilidade das micropartículas durante a mistura automática, antes da utilização.

Estabilidade:

em frasco fechado a 2-8°C:	até ao fim do prazo de validade indicado
após abertura a 2-8°C:	12 semanas
no analisador MODULAR ANALYTICS E170:	8 semanas
no analisador Elecsys 2010:	8 semanas
no analisador Elecsys 1010:	8 semanas (guardado alternadamente no frigorífico e no analisador - temperatura ambiente 20-25°C; até 20 horas no total quando aberto)

Colheita e preparação das amostras

Apenas as amostras indicadas em seguida foram testadas e consideradas aceitáveis.

O soro é colhido utilizando tubos de amostra padrão.

Plasma tratado com Li-heparina e EDTA-K₃.

Critério: Recuperação dentro de 90-110% do valor sérico ou declive 0,9-1,1 + intercepção dentro de $< \pm 2 \times$ sensibilidade analítica + coeficiente de correlação $> 0,95$.

Nota: Evitar a hemólise! Os eritrócitos contêm proteases que degradam a osteocalcina. Recomenda-se que o sangue seja centrifugado imediatamente.

Estabilidade do soro e do plasma heparinizado: 8 horas a 15-25°C, 3 dias a 2-8°C e 3 meses a -20°C. Congelar apenas uma vez.¹¹

Estabilidade do plasma EDTA: 2 dias a 15-25°C, 3 dias a 2-8°C, 3 meses a -20°C. Congelar apenas uma vez.¹¹

Os diferentes tipos de amostras incluídos na lista foram testados com base numa selecção de tubos de colheita de amostras comercialmente disponíveis na altura em que o teste foi realizado, i.e. nem todos os tubos dos diferentes fabricantes disponíveis no mercado foram testados. Os sistemas de colheita de amostras de diferentes fabricantes podem, por sua vez, conter materiais diferentes que, em alguns casos, podem afectar os resultados dos testes. Ao utilizar amostras em tubos primários (sistemas de colheita de amostras), consulte as instruções do fabricante dos tubos.

As amostras que contêm precipitado têm de ser centrifugadas antes da realização do ensaio. Não utilize amostras inactivadas por calor. Não utilize amostras e controlos estabilizados com azida.

Antes da determinação, certifique-se de que as amostras dos pacientes, os calibradores e os controlos estão à temperatura ambiente (20-25°C).

Devido a possíveis efeitos de evaporação, as amostras, os calibradores e os controlos colocados no analisador deverão ser analisados no prazo de duas horas.



N-MID Osteocalcin

Osteocalcina (OCN)

cobas

Materiais fornecidos

Consulte a secção "Reagentes - soluções de trabalho".

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Ref. 11972111, Elecsys N-MID Osteocalcin CalSet, para 4 x 1 ml
- Ref. 11972227, Elecsys PreciControl Bone, para 2 x 2 ml cada de PreciControl Bone 1, 2 e 3
- Ref. 11732277, Elecsys Diluent Universal, 2 x 18 ml de diluente de amostras ou Ref. 03183971, Elecsys Diluent Universal, 2 x 40 ml de diluente de amostras
- Equipamento normal de laboratório
- Analisadores Elecsys 1010/2010 ou MODULAR ANALYTICS E170

Acessórios para os analisadores Elecsys 1010 e 2010:

- Ref. 11662988, Elecsys ProCell, 6 x 380 ml de tampão do sistema
- Ref. 11662970, Elecsys CleanCell, 6 x 380 ml de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 11930346, Elecsys SysWash, 1 x 500 ml de aditivo para água de lavagem
- Ref. 11933159, Adaptador para SysClean
- Ref. 11706829, Elecsys 1010 AssayCup, 12 x 32 cuvetes de reacção ou Ref. 11706802, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 de cuvetes de reacção
- Ref. 11706799, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 pontas de pipeta

Acessórios para o analisador MODULAR ANALYTICS E170:

- Ref. 12135019, ProCell M, 1 x 2 l de tampão do sistema
- Ref. 12135027, CleanCell M, 1 x 2 l de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 03023141, PC/CC-Cups, 50 cuvetes para pré-aquecimento do ProCell M e do CleanCell M antes de usar
- Ref. 03005712, ProbeWash M, 12 x 70 ml de solução de limpeza para finalização da análise e lavagem durante a mudança de reagentes
- Ref. 03004899, PreClean M, 5 x 600 ml de solução de limpeza de detecção
- Ref. 12102137, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 tabuleiros x 84 cuvetes de reacção ou pontas de pipeta, sacos para lixo
- Ref. 03023150, Wasteliner, sacos para lixo
- Ref. 03027651, SysClean Adapter M

Acessórios para todos os analisadores:

- Ref. 11298500, Elecsys SysClean, 5 x 100 ml de solução de limpeza do sistema

Realização do ensaio

Para assegurar a correcta execução do ensaio, é importante cumprir as instruções fornecidas neste documento para o analisador utilizado.

Consulte o manual do operador apropriado para obter informações mais específicas sobre o ensaio feito no analisador.

A ressuspensão das micropartículas é efectuada automaticamente antes de usar. Introduza os parâmetros específicos do teste através dos códigos de barras dos reagentes. Se, em algum caso excepcional, não for possível ler o código de barras, o código numérico de 15 dígitos deverá ser introduzido manualmente.

Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010: Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aprox. 20°C e coloque-os no disco dos reagentes (20°C) do analisador. Evite a formação de espuma. O sistema regula **automaticamente** a temperatura dos reagentes e a abertura/fecho dos frascos.

Analisador Elecsys 1010: Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aprox. 20-25°C e coloque-os no disco dos reagentes/amostras do analisador (temperatura ambiente a 20-25°C). Evite a formação de espuma. **Abra** as tampas dos frascos **manualmente** antes de usar e **feche manualmente** depois de usar. Conserve a 2-8°C depois de usar.

Calibração

Rastreabilidade: Este método foi padronizado contra padrões de referência internos. osteocalcina numa matriz de soro humano isenta de analito.¹¹ Cada dispositivo de reagentes Elecsys N-MID Osteocalcin contém um código de barras com informações específicas para a calibração do lote de reagentes em questão. A curva principal previamente definida é adaptada ao analisador através do Elecsys N-MID Osteocalcin CalSet.

Frequência das calibrações: Uma calibração por lote de reagentes utilizando reagente recém-colocado (i.e., dentro de um máximo de 24 horas após ter sido registado no analisador). Devem ser feitas as seguintes recalibrações:

Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010:

- passado 1 mês (28 dias) quando se utiliza o mesmo lote de reagentes
- passados 7 dias (quando se utiliza o mesmo dispositivo de reagentes no analisador)

Analisador Elecsys 1010:

- com cada dispositivo de reagentes
- passados 7 dias (temperatura ambiente de 20-25°C)
- passados 3 dias (temperatura ambiente de 25-32°C)

Para todos os analisadores:

- conforme necessário: p. ex., em resultados de ensaios de controlo de qualidade fora dos limites especificados.

Verificação da calibração: Não é necessária. O software do analisador verifica automaticamente a validade da curva e alerta para eventuais desvios.

Controlo de qualidade

Para o controlo de qualidade, utilize o Elecsys PreciControl Bone 1, 2 e 3. Adicionalmente pode ser utilizado outro material de controlo adequado. Efectue os controlos dos diversos intervalos de concentração como determinações simples, pelo menos uma vez em cada 24 horas, quando o teste estiver a ser utilizado, uma vez por dispositivo de reagentes e a seguir a cada calibração. Os intervalos e limites de controlo devem ser adaptados às exigências específicas de cada laboratório. Os valores obtidos devem situar-se dentro dos limites definidos. Cada laboratório deve estabelecer as medidas correctivas a tomar no caso de os valores se situarem fora dos limites.

Cálculo

O analisador calcula automaticamente a concentração do analito de cada amostra (em ng/ml ou µg/l).

Limitações – interferências¹¹

O ensaio não é afectado pela icterícia (bilirrubina < 1.112 µmol/l ou < 65 mg/dl), lipemia (Intralipid < 1.500 mg/dl) e biotina < 50 ng/ml.

Critério: recuperação dentro de ± 10% do valor inicial. A hemólise interfere. Os eritrócitos contêm proteases que degradam a osteocalcina.

Nos doentes em tratamento com doses elevadas de biotina (i.e. > 5 mg/dia), as amostras só deverão ser colhidas no mínimo 8 horas após a última administração de biotina.

Não foi observada interferência do factor reumatóide até uma concentração de 2.200 U/ml.

Não foi observado qualquer efeito "high-dose hook" em concentrações de N-MID osteocalcina até 4.200 ng/ml.

Foram efectuados testes in vitro com 16 fármacos frequentemente utilizados. Não se encontrou qualquer interferência com o ensaio.

Tal como acontece com todos os testes que contêm anticorpos monoclonais de rato, este teste pode produzir resultados errados em amostras colhidas em pacientes tratados com este tipo de anticorpos ou que os receberam para fins de diagnóstico.

O risco potencial de interferência por interações imunológicas entre os componentes do teste e soros raros foi minimizado através da inclusão de aditivos adequados.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para o ruténio.

O teste contém aditivos que minimizam estes efeitos.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para a estreptavidina.

Quando o objectivo é o diagnóstico, os resultados devem ser sempre interpretados em conjunto com a anamnese do paciente, o exame clínico e outros resultados.

Intervalo de medição¹¹

0,500-300 ng/ml (definido pelo limite de detecção inferior e pelo máximo da curva principal). Os valores inferiores ao limite de detecção são indicados como < 0,500 ng/ml. Os valores acima do intervalo de medição são indicados como > 300 ng/ml (ou até 1.500 ng/ml no caso das amostras diluídas 5 vezes).



N-MID Osteocalcin

Osteocalcina (OCN)

cobas

Diluição

As amostras com concentrações de N-MID osteocalcina acima do intervalo de medição podem ser diluídas com o Elecsys Diluent Universal. A diluição recomendada é de 1:5 (feita automaticamente pelos analisadores MODULAR ANALYTICS E170 ou Elecsys 1010/2010 ou manualmente). A concentração da amostra diluída tem de ser > 60 ng/ml. Após a diluição manual, multiplique o resultado pelo factor de diluição. Após a diluição pelos analisadores, o software do analisador MODULAR ANALYTICS E170 e dos analisadores Elecsys 1010/2010 toma automaticamente em consideração a diluição ao calcular a concentração da amostra.

Valores teóricos¹¹

Os intervalos de referência são dependentes do teste. Os estudos concluídos com o analisador Elecsys N-MID Osteocalcin revelaram os seguintes intervalos em ng/ml:

	Nº de amostras	Osteocalcina N-MID 50º	Percentis 5-95
Mulheres saudáveis			
• Pré-menopausa, > 20 anos	108	23	11-43
• Pós-menopausa (sem TSH)	102	27	15-46
Doentes com osteoporose	120	27	13-48
Homens saudáveis			
• 18-< 30 anos	183	40	24-70
• 30-50 anos	179	25	14-42
• > 50-70 anos	125	24	14-46

Protocolo de estudo nº 9905 - 8/2000

Nos doentes com insuficiência renal, os valores de osteocalcina podem estar elevados, directamente por deficiência da clearance e, indirectamente, devido à osteodistrofia renal.¹²

Cada laboratório deve verificar a transferibilidade dos valores teóricos para a sua própria população de pacientes e, se necessário, determinar os seus próprios intervalos de referência.

Dados específicos sobre o desempenho¹¹

São apresentados a seguir dados representativos do desempenho nos analisadores. Os resultados podem diferir de laboratório para laboratório.

Precisão

A reprodutibilidade foi determinada com reagentes Elecsys, uma pool de soros humanos e controlos de acordo com um protocolo modificado (EP5-A) do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 vezes por dia durante 10 dias (n = 60), precisão intra-ensaio no analisador MODULAR ANALYTICS E170, n = 21. Obtiveram-se os seguintes resultados:

Elecsys 1010/2010		Precisão intra-ensaio		Precisão total	
Amostra	Média ng/ml	DP ng/ml	CV %	DP ng/ml	CV %
Soro humano 1	15,5	0,61	4,0	1,01	6,5
Soro humano 2	13,7	0,45	3,3	0,53	3,8
Soro humano 3	68,3	0,92	1,4	1,22	1,8
PreciControl Bone 1	21,9	0,54	2,5	0,76	3,5
PreciControl Bone 2	105,7	1,32	1,2	1,85	1,7
PreciControl Bone 3	205,5	2,45	1,2	3,54	1,7

MODULAR ANALYTICS E170		Precisão intra-ensaio			Precisão total		
Amostra	Média ng/ml	DP ng/ml	CV %	Média ng/ml	DP ng/ml	CV %	
Soro humano 1	6,95	0,05	0,7	7,04	0,11	1,6	
Soro humano 2	24,8	0,13	0,5	25,5	0,35	1,4	
Soro humano 3	76,4	0,64	0,8	78,1	1,14	1,5	
PreciControl Bone 1	22,2	0,10	0,5	22,5	0,28	1,3	
PreciControl Bone 2	94,9	1,06	1,1	96,7	1,08	1,1	
PreciControl Bone 3	196	1,40	0,7	198	2,39	1,2	

Sensibilidade analítica (limite de detecção inferior)

< 0,50 ng/ml

O limite de detecção representa o nível de analito mais baixo mensurável passível de ser distinguido de zero. É calculado como o valor situado dois desvios padrão (DP) acima do padrão mais baixo (calibrador principal, padrão 1 + 2 DP, precisão intra-ensaio, n = 21).

Comparação dos métodos

Uma comparação do teste Elecsys N-MID Osteocalcin (y) com um ensaio de rádio-fixação de N-MID osteocalcina à venda no mercado (x), utilizando amostras clínicas, teve como resultado as seguintes correlações (ng/ml): Número de amostras medidas: 185

Passing/Bablok ¹³	Regressão linear
y = 1,29x - 2,79	y = 1,43x - 6,24
τ = 0,866	r = 0,987
DP (md68) = 1,54	Sy.x = 3,28

As concentrações das amostras variaram entre aprox. 10 e 210 ng/ml.

Especificidade analítica

No caso dos anticorpos monoclonais utilizados, observaram-se as seguintes reacções cruzadas:

Não foi detectada reactividade cruzada com β-CrossLaps, hormona da paratiróide e fosfatase alcalina específica do osso.

Bibliografia

- Rosenquist C, Qvist P, Bjarnason N, Christiansen C. Measurement of a More Stable Region of Osteocalcin in Serum by ELISA with Two Monoclonal Antibodies. Clin Chem 1995;41(10):1439-1445.
- Delmas PD, 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(4):470-476.
- Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, Riggs BL. Effects of Renal Function on Plasma Levels of Bone Gla Protein. J Clin Endocrinol Metab 1983;57(5):1028-1030.
- Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterisation of Immunoreactive Forms of Human Osteocalcin Generated In Vivo and In Vitro. J Bone Miner Res 1994;9(2):255-264.
- Chen J-T, Hosoda K, Hasumi K, Ogata E, Shiraki M. Serum N-Terminal Osteocalcin is a Good Indicator for Estimating Responders to Hormone Replacement Therapy in Postmenopausal Women. J Bone Miner Res 1996;11(11):1784-1792.
- Garnero P, Delmas PD. New Developments in Biological Markers for Osteoporosis. Calcif Tissue Int 1996;59(1):2-9.
- Epstein S. Bone-Derived Proteins. Trends Endocrinol Metab 1989;1:9-14.
- Brown JP, Malaval L, Chapuy MC, Delmas PD, Edouard C, Meunier PJ. Serum bone GLA protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. Lancet 1984;1091:1093.
- Ravn P, Christensen JO, Baumann M, Clemmesen. Changes in Biochemical Markers and Bone Mass After Withdrawal of Ibandronate Treatment: Prediction of Bone Mass Changes During Treatment. Bone 1998;22(5):559-564.
- Gundberg CM. Biology, Physiology, and Clinical Chemistry of Osteocalcin. J Clin Ligand Assay, 1998 21;2:128-138.
- Documentação da Roche Diagnostics.
- Masters PW, et al. Commercial assays for serum osteocalcin give clinically discordant results. Clin Chem 1994;40(3):358-363.
- Bablok W, et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.

NOTA PARA O COMPRADOR: LIMITED LICENSE

A aquisição deste produto permite que o comprador o utilize exclusivamente para diagnóstico in vitro humano pela tecnologia ECL. Nenhuma patente geral ou outra licença de qualquer tipo, à excepção deste direito específico de uso de compra, é concedida por este meio. Este produto não pode ser usado pelo comprador na pesquisa/desenvolvimento em ciências da vida, em testes de auto-diagnóstico, na identificação/desenvolvimento de drogas ou em qualquer utilização ou teste veterinário, alimentar, de água ou ambiental.

Para mais informações, consulte o manual do operador adequado ao analisador, as folhas de aplicação respectivas, a informação do produto e os folhetos informativos de todos os componentes necessários.



N-MID Osteocalcin

Osteocalcina (OCN)

cobas

As alterações ou os acréscimos significativos estão assinalados por uma barra de alteração na margem. As alterações dos parâmetros de teste do código de barras do reagente que já foram introduzidas devem ser editadas manualmente.

©2005 Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

