

FGF23 (INTACT)

(EN) ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN
INTACT FGF23 IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, AND CITRATE PLASMA
Cat. No. BI-20700 . 12 x 8 TESTS

(DE) ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON HUMANEM,
INTAKTEM FGF23 IN EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA UND CITRAT PLASMA
Kat. Nr. BI-20700 . 12 x 8 TESTE

(FR) ELISA POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE FGF23 (INTACT) HUMAIN
DANS LE PLASMA EDTA, LE PLASMA HEPARINE ET LE PLASMA CITRATE
Cat. No. BI-20700 . 12 x 8 TESTS

(IT) ELISA PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI FGF23 (INTATTO)
UMANO SU CAMPIONI DI PLASMA-EDTA, PLASMA-EPARINA E PLASMA-CITRATO
Cat. No. BI-20700 . 12 x 8 DETERMINAZIONI

(ES) ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE FGF23
(INTACTO) HUMANO EN PLASMA-EDTA, PLASMA HEPARINIZADO Y PLASMA CITRATO
Cat. No. BI-20700 . 12 x 8 TESTS

Not for Sale in the United States!

Rev.no. 190807

This kit was developed and manufactured by:
Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/29107 45, Fax +43/1/29107 6389, e-mail info@bmgrp.com



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 9
FRANCAIS	Page 13
ITALIANO	Pagina 17
ESPANOL	Pagina 21

This ELISA is optimized and validated for human plasma samples. Serum and other sample types are compatible with this ELISA (for more information please visit our website).

Detailed information on the FGF23 (intact) human ELISA, e.g. assay validation data, sample matrix comparisons, and stability data is available on our website.

Dieser ELISA ist für humane Plasmaproben optimiert und validiert. Serum und andere Probenarten sind mit diesem ELISA kompatibel (weitere Informationen finden Sie auf unserer Website).

Detaillierte Informationen und Validierungsdaten zum FGF23 (intakt) human ELISA, wie z.B. Probenmatrix Vergleiche und Probenstabilität finden Sie auf unserer Webseite.

Le kit ELISA est optimisé et validé et pour les échantillons humains. Le sérum et les autres types d'échantillons sont compatibles avec cet ELISA (pour plus d'information visitez notre site web)

Les informations détaillées sur le FGF23 (intact) comme les données de validation, comparaison des différentes matrices, et les données de stabilités sont disponibles sur notre site web.

Questo ELISA è ottimizzato e validato per campioni di plasma umano. Il siero e altri tipi di campioni sono compatibili con questo ELISA (per ulteriori informazioni, visitare il nostro sito Web).

Informazioni dettagliate sull'ELISA umano FGF23 (intatto), ad es. dati di convalida del dosaggio, confronti di matrici di esempio e dati di stabilità sono disponibili sul nostro sito Web.

Este ELISA está optimizado y validado para muestras de plasma humano. Suero y otro tipo de muestras son compatibles con este ELISA (para más información, por favor visite nuestro sitio web).

La información detallada para el ELISA de FGF23 (intacto) humano, p.ej. datos de validación del ensayo, comparaciones de matriz de muestras, y datos de estabilidad, están disponibles en nuestro sitio web.

www.bmgrp.com

Authorized Representative for Registration:

mdi Europa GmbH
Langenhagener Str. 71
D-30855 Hannover-Langenhagen

1) INTRODUCTION

FGF23 (fibroblast growth factor 23) is a member of the fibroblast growth factor family and controls phosphate and vitamin D homeostasis. The full-length protein comprises 251 amino acids including a 24 amino acid signal peptide. The N-terminal FGF region of FGF23 is separated from the C-terminal region by a proteolytic cleavage site. A fraction of FGF23 is proteolytically processed between arginine179 and serine180 to generate N-terminal and C-terminal fragments. Therefore, the main forms of FGF23 present in human circulation are hormonally intact FGF23 and inactive N-terminal and C-terminal fragments. FGF23 binds to FGF receptor 1c (FGFR1c) with its N-terminal region, while the C-terminal region interacts with the co-receptor α -Klotho to confer high-affinity binding to the receptor. FGFR1c and α -Klotho are expressed in the distal nephron and the parathyroid gland. Co-receptor independent signaling of FGF23 has been described for other FGFRs, which are expressed in a variety of tissues. The main source of FGF23 are osteocytes in the bone.

Areas of interest:

Bone Diseases

Autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), autosomal recessive hypophosphatemic rickets (ARHR), X-linked hypophosphatemic rickets (XLH), McCune-Albright syndrome/fibrous dysplasia, hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism (HRHPT), drug-induced rickets/osteomalacia, hyperphosphatemia, hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome, fibrous dysplasia, neurofibromatosis, osteoglophonic dysplasia (OGD), linear nevus sebaceous syndrome (LNSS)/epidermal nevus syndrome (ENS), Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia

Cancer

Tumor-induced osteomalacia, familial tumor calcinosis

Cardiovascular Disease

Heart failure, left-ventricular hypertrophy, vascular calcification

Endocrine disorders

Primary hyperparathyroidism, secondary hyperparathyroidism

Kidney Disease

Chronic kidney disease (CKD), chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD), chronic kidney disease and cardiovascular disease, acute kidney injury

Metabolic disorders

Dyslipidemia, type 2 diabetes, anemia

2) CONTENTS OF THE KIT

CONTENTS	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Recombinant monoclonal anti-human FGF23 antibody precoated microtiter strips in strip holder, packed in aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate, 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 10 ml
STD	Standards (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), recombinant human FGF23 in human plasma, white caps, lyophilized	7 vials
CTRL	Controls A and B, yellow caps, lyophilized, exact concentration see labels	2 vials
CONJ	Conjugate (monoclonal mouse anti-human FGF23-HRP), amber cap, ready to use	1 x 7 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 13 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 1 self-adhesive plastic film
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 10 µl, 50 µl, 100 µl, 400 µl, and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- EP-tubes for sample dilution if pre-dilution is necessary
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation/dilution:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes. Perform plasma or serum separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices. **Assay the acquired samples immediately or aliquot and store at -25°C or lower.** Lipemic or haemolyzed samples may give erroneous results. Samples are stable for at least four freeze-thaw cycles. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

Samples with values above Standard 7 (STD7) can be diluted 1:11 (1+10), e.g. 10 µl sample + 100 µl ASYBUF, and tested again.

The kit includes sufficient assay buffer (ASYBUF) for a 1:11 dilution of 40 samples (in duplicates). Additional ASYBUF can be ordered using cat.no. BI-20700-ASYBUF.

Due to the instability of the intact FGF23 molecule samples should be collected, processed, aliquoted and stored at -25°C or below as quickly as possible.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution/handling:

WASHBUF (wash buffer): Dilute the concentrate 1:20, e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled or deionized water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF when performing the assay.

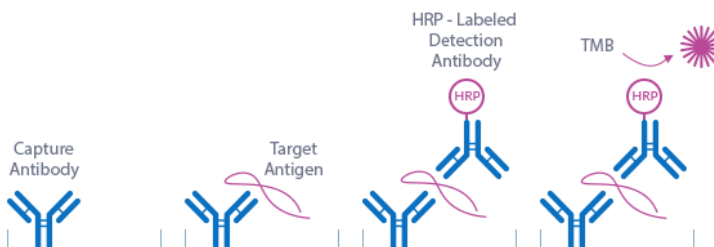
STD (standards) + CTRL (controls): Pipette 400 µl of distilled or deionized water into each vial. Leave at room temperature (18-24°C) for 15 min. Vortex gently. The exact concentration is printed on the label. Reconstituted STD and CTRL can be stored at -25°C or lower until expiry date stated on the label. STDs and CTRLs are stable for four freeze-thaw cycles.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

The FGF23 (intact) human ELISA kit is a sandwich enzyme immunoassay that has been optimized and validated for the quantitative determination of intact FGF23 in human plasma samples. Serum and other sample types are compatible with this ELISA. For further information on serum measurements please see page 6/7 or visit our website (see Validation Data).

In a first step, standard/control/sample and conjugate (monoclonal mouse anti-human FGF23-HRP) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with a recombinant monoclonal anti-human FGF23 antibody. FGF23 present in the standard/control/sample binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the conjugated anti-human FGF23-HRP antibody. In a washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the substrate (TMB, tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme-catalyzed color change of the substrate is directly proportional to the amount of intact FGF23 present in the sample. This color change is detectable with a standard microplate reader. A dose response curve of the

absorbance (optical density, OD at 450 nm) using the values obtained from the standards versus the standard concentration is generated. The concentration of intact FGF23 in the sample is determined directly from the dose response curve.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-24°C) before use in the assay.

Mark position for STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) on the protocol sheet.

Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

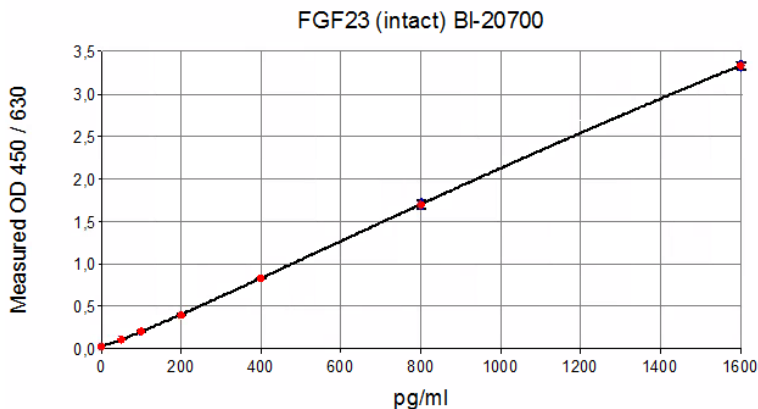
1. Pipette 50 µl STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) in duplicate into respective well.
2. Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well, mix gently.
3. **Cover the plate tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-24°C), in the dark.**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
5. Add 100 µl SUB (substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (18-24°C), in the dark.**
7. Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
8. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Construct a standard curve from the absorbance read-outs of the standards using commercially available software capable of generating a four-parameter logistic (4-PL) fit. Alternatively, plot the standards' concentration on the x-axis against the mean absorbance for each standard on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. Curve fitting algorithms other than 4-PL have not been validated and will need to be evaluated by the user.

Obtain sample concentrations from the standard curve. If required, the pg/ml concentration can be converted into pmol/l by applying a conversion factor (1 pg/ml = 0.038 pmol/l; MW: 26 kDa). Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

Example of a typical standard curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the standard with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips		
Sample type(s)*	EDTA plasma, heparin plasma, citrate plasma		
Sample volume	50 µl / well		
Assay time	3 h / 30 min		
Detection limit	5.4 pg/ml		
Standard range	0 - 1600 pg/ml		
Conversion factor	1 pg/ml = 0.038 pmol/l; MW: 26 kDa		
Precision		n	CV (%)
	Within-run	3	≤8
	In-between-run	9	≤6
Accuracy		n	Recovery (%)
	EDTA plasma	6	100
	Heparin plasma	1	79
	Citrate plasma	1	103
	Serum	6	91

Dilution linearity of endogenous intact FGF23		n	Recovery of expected dilution (%)		
			1+1	1+3	1+7
	EDTA plasma	5	107	108	111
	Heparin plasma	1	99	97	107
	Citrate plasma	1	143	137	130
Serum	6	87	74	67	
Specificity	Endogenous and recombinant human intact FGF23				
Use	CE marked – for IVD use in the EU.				
Values for apparently healthy donors		n	Median intact FGF23 [pg/ml]		
	EDTA plasma	22	24.4 pg/ml		
	Heparin plasma	22	26.4 pg/ml		
	Citrate plasma	22	17.4 pg/ml		
Serum	22	14.8 pg/ml			

* This ELISA is optimized and validated for human plasma samples. Serum and other sample types are compatible with this ELISA. For further information on serum measurement and assay performance characteristics, matrix comparisons and stability data please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Within-run (intra-assay): 2 samples of known concentrations were tested 3 times within 1 kit lot by 1 operator.
In-between-run (inter-assay): 2 samples of known concentrations were tested 9 times within 2 kit lots by 2 operators.

Within-run (n=3)	Sample 1	Sample 2	In-between-run (n=9)	Sample 1	Sample 2
Mean (pg/ml)	99	800	Mean (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	8.4	10.2	SD (pg/ml)	5.9	15.2
CV (%)	8	1	CV (%)	6	2

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colorless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious. All liquid reagents contain ≤0.1% Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke, or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses, and lab coat while performing this assay.

- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!

13) LITERATURE

1. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting. Bachetta J et al., *Metabolism* 2019; Epub ahead of print.
2. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. Vervloet M, *Nature Rev* 2019; 15:109-119.
3. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. Chande S and Bergwitz C, *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(11):637-655.
4. FGF23 Actions on Target Tissues-With and Without Klotho. Richter B and Faul CF, *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:189.
5. FGF23 in Cardiovascular Disease: Innocent Bystander or Active Mediator? Stöhr R et al., *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:351.
6. FGF23 beyond Phosphotropic Hormone. Takashi Y and Fukumoto S, *Trends Endocrinol Metab*, 2018; 29(11):755-767.
7. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. Chande S and Bergwitz C, *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(11):637-655.
8. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. Erben RG and Andrukhova O, *Bone* 2017; 100:62-68.
9. Fibroblast Growth Factor 23-Mediated Bone Disease. Goncivlea AR and Jan De Beur SM, *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017; 46(1):19-39.
10. Posttranslational processing of FGF23 in osteocytes during the osteoblast to osteocyte transition. Yamamoto H et al., *Bone* 2016; 84:120-130.
11. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. Wolf M and White KE., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23(4):411-419.
12. FGF23 from bench to bedside. Kovesdy CP and Quarles LD, *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 310(11):F1168-1174.

EINLEITUNG

FGF23 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23) gehört zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und kontrolliert die Phosphat- und Vitamin-D-Homöostase. Das gesamte FGF23-Protein umfasst 251 Aminosäuren einschließlich dem 24-Aminosäuren-Signalpeptid. FGF23 wird zwischen Arginin179 und Serin180 proteolytisch gespalten und bildet N-terminale und C-terminale Fragmente. Die im menschlichen Blutkreislauf vorhandenen Hauptformen von FGF23 sind daher biologisch aktives intaktes FGF23 und inaktive N-terminale und C-terminale Fragmente. FGF23 bindet mit seiner N-terminalen Region an den FGF-Rezeptor 1c (FGFR1c), während die C-terminale Region mit dem α Klotho-Co-Rezeptor interagieren kann, um dem Rezeptor eine hochaffine Bindung zu verleihen. FGFR1c und α Klotho werden im distalen Nephron und in der Nebenschilddrüse exprimiert. Für andere FGFRs, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden, wurde eine vom Korezeptor unabhängige Aktivierung durch FGF23 beschrieben. Die Hauptquelle von FGF23 sind die Osteozyten im Knochen.

Interessensgebiete:

Siehe Kapitel 1) *INTRODUCTION* im englischen Teil des Beipacktextes.

2) INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Rekombinanter monoklonaler anti-humaner FGF23 Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20-fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Assaypuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
STD	Standards (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), rekombinantes humanes FGF23 in humanem Plasma, weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A und B, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentrationen siehe Etiketten)	2 Fläschchen
CONJ	Konjugat (monoklonaler Maus anti-human FGF23-HRP), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 400 μ l, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar.

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Plasma oder Serum. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie

möglich. Das gewonnene Plasma oder Serum **sollte sofort gemessen** oder für Langzeitlagerung aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu vier Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

Proben mit Werten höher als Standard 7 (STD7) können mit ASYBUF (Assaypuffer) 1:11 (1+10, z.B. 10 µl Probe + 100 µl ASYBUF) verdünnt und erneut getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution/Handhabung:

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (z.B. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

STD (Standards) und CTRL (Kontrollen): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 400 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur (18-24°C) für 15 min. Gut mischen. Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt. Rekonstituierte STDs und CTRLs können bei -25°C oder tiefer bis zum Ablaufdatum gelagert werden. STD und CTRL sind für vier Frier/Tau-Zyklen stabil.

6) TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von intaktem FGF23 in humanen Plasmaproben.

Zuerst werden Standard/Kontrolle/Probe und Konjugat (monoklonaler Maus anti-human FGF23-HRP) in die entsprechenden Vertiefungen, welche mit einem rekombinanten monoklonalen anti-human FGF23-Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Das in den Standard/Kontrolle/Probe vorhandene FGF23 bildet mit beiden Antikörpern einen stabilen Komplex. Durch Waschen werden die unspezifischen und nicht gebundenen Anteile entfernt. In einem zweiten Schritt wird das Substrat (TMB, Tetramethylbenzidin) in die Vertiefungen pipettiert. Die dadurch enzymatisch bedingte Farbentwicklung ist direkt proportional mit der FGF23 Konzentration in den Proben und kann mittels eines Mikrotiterplattenphotometer gemessen werden. Aus der jeweiligen Absorption und den Konzentrationen der STD wird eine Kalibrationskurve erstellt, von der die FGF23 Konzentration der Proben direkt ablesbar ist.

Schema siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-24°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für STD/CTRL/PROBE (Standard/Kontrolle/Probe) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

- 1) Pipettieren Sie 50 µl STD/CTRL/PROBE (Standard/Kontrolle/Probe) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen.
- 2) Pipettieren Sie 50 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 3) **Streifen abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 4) Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 5) Pipettieren Sie 100 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
- 6) **Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.**
- 7) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.

8) Absorption unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die Absorption (optische Dichte; OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STDs unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels eines 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswertungsalgorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Bei Bedarf kann die pg/ml Konzentration durch Anwendung eines Umrechnungsfaktors in pmol/l umgerechnet werden (1 pg/ml = 0,038 pmol/l; MW: 26 kDa). Eventuelle Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

In dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der entsprechenden Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD7 den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well detachable strips				
Probentyp*:	EDTA Plasma, Heparin Plasma und Citrat Plasma				
Probenvolumen:	50 µl / Well				
Inkubationszeiten:	3 h / 30 min				
Detektionslimit:	5,4 pg/ml				
Standardbereich:	0 - 1600 pg/ml (7 Standards und 2 Kontrollen in einer humanen Plasma Matrix).				
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	Intaktes FGF23: 1 pg/ml = 0,038 pmol/l; MW: 26 kDa				
Präzision:		n	CV (%)		
	Within-run	3	≤8		
	In-between-run	9	≤6		
Wiederfindung nach Spike mit rekombinantes intaktes FGF23		n	Wiederfindung (%)		
	EDTA plasma	6	100		
	Heparin plasma	1	79		
	Citrate plasma	1	103		
	Serum	6	91		
Verdünnungslinearität endogenes intaktes FGF23		n	Wiederfindung nach Verdünnung (%)		
			1+1	1+3	1+7
	EDTA plasma	6	107	108	111
	Heparin plasma	1	99	97	107
	Citrate plasma	2	129	112	126
Serum	6	87	74	67	
Spezifität	Dieser Assay erkennt endogenes und rekombinantes humanes intaktes FGF23.				

Verwendungszweck:	CE-markiert. Zur in-vitro-Diagnostik in der EU.		
Werte von anscheinend gesunden Spendern:		n	Median FGF23 (intact) [pg/ml]
	EDTA plasma	22	24,4
	Heparin plasma	22	26,4
	Citrat plasma	22	17,4
	Serum	22	14,8

* Dieser ELISA ist für humane Plasmaproben optimiert und validiert. Serum und andere Probenarten sind jedoch mit diesem ELISA kompatibel. Nähere Informationen zur Messung von Serum, zu den Testmerkmalen und dem Matrixvergleich wie auch Daten zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

9) PRÄZISION

Within-run (Intra-assay): 2 Proben bekannter Konzentration wurden 3fach von 1 Operator getestet.

In-between-run (Inter-assay): 2 Proben bekannter Konzentration wurden 9fach in 2 Kitlots von 2 Operatoren getestet.

Within-run (n=3)	Probe 1	Probe 2	In-between-run (n=9)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pg/ml)	99	800	Durchschnitt (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	8,4	10,2	SD (pg/ml)	5,9	15,2
VK (%)	8	1	VK (%)	6	2

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,01\%$ Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrillen und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

1) INTRODUCTION

FGF23 (facteur 23 de croissance du fibroblaste) appartient à la famille des facteurs de croissance des fibroblastes et contrôle l'homéostasie du phosphate et de la vitamine D. La protéine complète comprend 251 acides aminés, y compris un peptide signal de 24 acides aminés. La région FGF N-terminale de FGF23 est séparée de la région C-terminale par un site de clivage protéolytique. Une fraction de FGF23 est clivée par protéolyse entre l'arginine 179 et la sérine 180 pour générer des fragments N-terminaux et C-terminaux. Par conséquent, les principales formes de FGF23 présentes dans la circulation sanguine sont le FGF23 intact ainsi que les fragments inactifs de N-terminal et de C-terminal. Le FGF23 se lie au récepteur 1c du FGF (FGFR1c) avec sa région N-terminale, tandis que la région C-terminale interagit avec le co-récepteur α -Klotho pour conférer une liaison de haute affinité au récepteur. FGFR1c et α -Klotho sont exprimés dans le néphron distal et dans la glande parathyroïde. Les ostéocytes dans les os constituent la source principale de FGF23.

Centre d'intérêt :

Maladie osseuses:

Le rachitisme hypophosphatémique autosomique dominant (ADHR), le rachitisme hypophosphatémique récessif autosomique (ARHR), le rachitisme hypophosphatémique lié à l'X (XLH), le syndrome de McCune-Albright / dysplasie fibreuse, le rachitisme hypophosphatémique et l'hyperparathyroïdie (HRHPT), rachitisme / ostéomalacie d'origine médicamenteuse, hyperphosphatémie, dysplasie fibreuse, neurofibromatose, dysplasie ostéoglyphonique, syndrome de sébacées linéaires naevus (LNSS) / syndrome de naevus épidermique (ENS), chondrodysplasie métaphysaire de type Jansen

Cancer:

Ostéomalacie induite par une tumeur, calcinose tumorale familiale

Maladie cardiovasculaire :

Insuffisance cardiaque, hypertrophie ventriculaire gauche, calcification vasculaire

Désordres endocriniens:

Hyperparathyroïdie primaire, hyperparathyroïdie secondaire

Maladies rénales:

Insuffisance rénale chronique (ICR), maladie rénale chronique - troubles des minéraux et des os (CKD-MBD), maladie rénale chronique et maladie cardiovasculaire, lésion rénale aiguë

Maladies métaboliques:

Dyslipidémie, diabète de type 2, anémie

2) CONTENU DE LA TROUSSE

CONTENU	COMPOSANTS DE LA TROUSSE	QUANTITÉ
PLATE	Plaques de barrettes de microtitration revêtues d'anticorps monoclonal humain recombinant anti-FGF23, avec support pour barrettes. Conditionnées en sachets alu avec dessicatif.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon transparent	1 x 50 ml
ASYBUF	Tampon de dosage, bouchon rouge, prêt à l'emploi	1 x 10 ml
STD	Étalons 1-7 (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), FGF23 humain recombinant dans sérum humain, bouchons blancs, lyophilisés	7 ampoules
CTRL	Contrôles A + B, bouchon jaune, lyophilisés (pour la concentration exacte voir étiquette)	2 ampoules
CONJ	Conjugué (monoclonal mouse anti-human FGF23-HRP), bouchon marron, prêt à l'emploi	1 x 7 ml
SUB	Substrat (solution TMB), flacon marron, bouchon bleu, prêt à l'emploi	1 x 13 ml
STOP	Solution stop, bouchon blanc, prêt à l'emploi	1 x 7 ml

3) AUTRE MATÉRIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 1 bandes de film adhésif
- Protocole de contrôle de la qualité
- Une feuille de protocole
- Notice d'utilisation

4) MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Micropipettes de précision calibrées pour distribuer 10 µl, 50 µl, 100 µl, 400 µl, et embouts jetables
- Eau distillée ou désionisée
- Un laveur de plaques est conseillé, alternatives: pipette multicanaux, distributeurs
- Réfrigérateur à 4°C (2-8°C)
- Photomètre pour microplaques équipé d'un filtre à 450 nm (référence 630 nm)
- EP tubes pour la dilution de l'échantillon si une prédilution est nécessaire
- Papier millimétré ou logiciel pour le calcul des résultats

5) PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET DES ÉCHANTILLONS

Tous les réactifs tels qu'ils sont fournis dans la trousse restent stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque réactif.

Préparation/dilution des échantillons :

Recueillir des échantillons de sang veineux en utilisant des tubes de prélèvement de sang standardisés. Effectuer une séparation du plasma ou du sérum par centrifugation conformément aux instructions du fournisseur pour les dispositifs de collecte de sang. **Dosez les échantillons acquis immédiatement ou conservez les à une température inférieure à -25°C.** Les échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent fournir des résultats erronés. Les échantillons restent stables jusqu'à 4 cycles de congélation / décongélation. Bien mélanger les échantillons avant utilisation. Nous recommandons l'utilisation de doublons pour toutes les valeurs.

Si les échantillons indiquent des valeurs plus élevées que STD7, nous recommandons de diluer les échantillons à 1:11 (1 + 10, par exemple 10 µl d'échantillon + 100 µl d'ASYBUF) et de tester à nouveau.

La trousse comprend suffisamment de tampon de dosage (ASYBUF) pour une dilution à 1:11 de 40 échantillons. Il est possible de commander de l'ASYBUF supplémentaire avec cat.no. BI-20700-ASYBUF.

Pour plus d'informations sur la stabilité des échantillons, veuillez vous rendre sur notre site Web à l'adresse www.bmgrp.com (voir [Validation Data](#)) ou contacter notre service client par courriel à l'adresse info@bmgrp.com ou par téléphone au +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution/Manipulation :

WASHBUF (Tampon de lavage): Diluer le concentré à 1:20, par exemple 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée. Les cristaux présents dans le concentré de tampon se dissolvent à température ambiante. Le WASHBUF non dilué reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le WASHBUF dilué reste stable jusqu'à un mois à 4°C (2-8°C). N'utiliser que du WASHBUF dilué pour exécuter le dosage.

STD (Étalons) + CTRL (Contrôles): Distribuer 400 µl d'eau distillée ou désionisée dans chaque ampoule. Laisser à température ambiante (18-24°C) pendant 15 min. Faire tourner doucement. La concentration exacte est imprimée sur l'étiquette. Les STD et CTRL reconstitués restent stables à -25°C ou moins jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les STD et CTRL restent stables jusqu'à 4 cycles de congélation/décongélation.

6) PRINCIPE DU DOSAGE

Cette trousse de FGF23 (intact) été optimisé et validée pour la détermination quantitative du FGF23 (intact) dans des échantillons de plasma humain. Le sérum et d'autres types d'échantillons sont compatibles avec cette trousse ELISA. Veuillez consulter page 6/7 ou veuillez rendre sur notre site Web (voir Données de validation) pour plus d'informations.

Dans une première étape, l'échantillon, contrôle et conjugué (monoclonal mouse anti-human FGF23-HRP) sont distribués dans les puits des barrettes de microtitration, qui sont revêtus d'anticorps monoclonal recombinant anti-humain FGF23. Le FGF23 présent dans l'échantillon se lie à l'anticorps de capture et forme un sandwich avec l'anticorps de détection (conjugué anti-human FGF23-HRP). Tout matériel non lié non-spécifique est ensuite éliminé par lavage. Dans une seconde étape, le substrat (TMB, tetramethylbenzidine) est distribué dans les puits. Le changement de couleur par catalyse enzymatique du substrat est directement proportionnel à la quantité de FGF23

présente dans l'échantillon. Ce changement de couleur peut être détecté par un photomètre pour microplaques standard.

Voir l'illustration au chapitre 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* de la version anglaise de la notice.

7) PROTOCOLE DU DOSAGE

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-24°C) avant d'être utilisés dans le dosage.

Marquer les positions pour STD/CTRL/ Échantillon (Étalon/Contrôle/Échantillon) sur la feuille de protocole.

Sortir les barrettes de microtitration du sachet alu. Les barrettes inutilisées peuvent être conservées dans le sachet alu avec le dessicatif à une température de 4°C (2-8°C). Les barrettes restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

1. Distribuer 50 µl de STD/CTRL/Échantillon (Étalon/Contrôle/Échantillon/) en double dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 50 µl CONJ (Conjugué, bouchon marron) dans chaque puits, agiter doucement.
3. **Sceller la plaque avec le band de film adhésif et incuber pendant 3 heures à température ambiante (18-24°C) dans l'obscurité.**
4. Aspirer le contenu des puits et les laver 5 fois avec 300 µl de WASHBUF dilué (Tampon de lavage, bouchon transparent). Éliminer tout WASHBUF restant en tapant fortement la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage.
5. Ajouter 100 µl de SUB (Substrat, bouchon bleu) dans chaque puits, agiter doucement.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18-24°C) dans l'obscurité.**
7. Ajouter 50 µl de STOP (Solution stop, bouchon blanc) dans chaque puits, agiter doucement.
8. Mesurer immédiatement l'absorbance à 450 nm avec une référence à 630 nm, si possible.

8) CALCUL DES RÉSULTATS

Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs de DO des étalons. Utiliser un logiciel prévu à cet effet ou du papier millimétré vendu couramment dans le commerce. Obtenir la concentration des échantillons à partir de cette courbe d'étalonnage. Le système de dosage a été évalué avec logit-log et un algorithme d'ajustement à 4 paramètres (4PL). Différents algorithmes d'ajustement doivent être évalués par l'utilisateur.

Obtenir les concentrations de l'échantillon à partir de la courbe standard. Si nécessaire, la concentration en pg/ml peut être convertie en pmol/l en appliquant un facteur de conversion (1 pg/ml = 0,038 pmol/l, MW: 26 kDa). Les facteurs de dilution respectifs doivent être pris en compte dans le calcul de la concentration finale de l'échantillon.

Exemple de courbe de STD typique :

Voir au chapitre 8) *CALCULATION OF RESULTS* dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle qualité fourni avec la trousse présente les résultats du contrôle qualité de la version finale pour chaque lot de trousse. Les données de densité optique obtenues par les utilisateurs peuvent être différentes en raison de diverses influences et/ou de la diminution normale de l'intensité du signal pendant la durée de conservation en emballage non ouvert. Cependant, cela n'affecte pas la validité des résultats tant que la densité optique de l'étalon ayant la concentration la plus élevée est au moins égale à 1,50 et que les valeurs de CTRL sont situées dans une plage acceptable (pour les plages cibles, voir les étiquettes).

9) CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Voir au chapitre 9) *ASSAY CHARACTERISTICS* dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le kit ELISA est optimisé et validé et pour les échantillons humains. Le sérum et les autres types d'échantillons sont compatibles avec cet ELISA. Pour plus d'informations sur les caractéristiques du dosage, veuillez-vous rendre sur notre site web à l'adresse www.bmgrp.com (voir Validation Data) ou contacter notre service client par courriel à

l'adresse info@bmgrp.com ou par téléphone au +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÉCISION

Intra-série (within-run): 2 échantillons de concentration connue ont été testés 3 fois dans 1 lot de trousse par 1 opérateur.

Inter-série (inbetween run): 2 échantillons de concentration connue ont été testés 9 fois dans 2 lot de trousse par 2 opérateurs.

Within-run (n=3)	Sample 1	Sample 2	In-between-run (n=9)	Sample 1	Sample 2
Mean (pg/ml)	99	800	Mean (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	8.4	10.2	SD (pg/ml)	5.9	15.2
CV (%)	8	1	CV (%)	6	2

Des informations détaillées sur le dosage ELISA FGF23 (intact), par ex. les caractéristiques de performance du dosage, les comparaisons de matrices, ainsi que les données de stabilité, sont disponibles sur notre site web www.bmgrp.com (voir Validation Data).

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas mélanger les réactifs de lots ou de tests différents.
- Ne pas intervertir les embouts ou bouchons de réactifs différents.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
- Protéger les réactifs contre les rayons du soleil.
- La solution de substrat doit rester incolore jusqu'au moment où elle est ajoutée à la plaque.
- Pour garantir des résultats précis, il est nécessaire de bien sceller les plaques pendant les étapes d'incubation.
- Éviter de faire mousser en mélangeant les réactifs.

12) PRÉCAUTIONS

Tous les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés contre le VIH-Ab, VCH-Ab et l'AghBs avec des résultats négatifs.

Néanmoins, ils doivent être manipulés et éliminés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Tous les réactifs liquides contiennent $\leq 0,1\%$ de Proclin 950 comme conservateur. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses.

Le Proclin 950 n'est pas toxique aux concentrations utilisées dans cette trousse. Il peut toutefois provoquer des réactions cutanées allergiques – éviter tout contact avec la peau et les yeux.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer des produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs.
- Porter des gants, des lunettes et une blouse de laboratoire pendant l'exécution du dosage.
- L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. Irritations possibles. Rincer abondamment à l'eau claire en cas de contact !

13) BIBLIOGRAPHIE

Voir au chapitre 13) LITERATURE dans la version anglaise de cette notice.

1) INTRODUZIONE

FGF23 (fattore di crescita dei fibroblasti 23) è un membro della famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti e controlla l'omeostasi del fosfato e della vitamina D. La proteina a lunghezza intera comprende 251 aminoacidi incluso un peptide di segnale di 24 aminoacidi. La regione FGF N-terminale di FGF23 è separata dalla regione C-terminale da un sito di scissione proteolitica. Una frazione di FGF23 viene elaborata proteoliticamente tra arginina179 e serina180 per generare frammenti N-terminale e C-terminale. Pertanto, le principali forme di FGF23 presenti nella circolazione umana sono FGF23 ormonalmente intatte e frammenti N-terminali e C-terminali inattivi. FGF23 si lega al recettore FGF 1c (FGFR1c) con la sua regione N-terminale, mentre la regione C-terminale interagisce con il co-recettore α -Klotho per conferire un legame ad alta affinità al recettore. FGFR1c e α -Klotho sono espressi nel nefrone distale e nella ghiandola paratiroidea. La segnalazione indipendente da co-recettore di FGF23 è stata descritta per altri FGFR, che sono espressi in una varietà di tessuti. La fonte principale di FGF23 sono gli osteociti nell'osso.

Aree di interesse:

Malattie ossee

Rachitismo ipofosfatemico autosomico dominante (ADHR), rachitismo ipofosfatemico autosomico recessivo (ARHR), rachitismo ipofosfatemico legato all'X (XLH), sindrome di McCune-Albright / displasia fibrosa, rachitismo ipofosfatemico, ipertermia / ipertermia sindrome da iperostosi-iperfosfatemia, displasia fibrosa, neurofibromatosi, displasia osteoglofonica (OGD), sindrome sebacea del nervo lineare (LNSS) / sindrome del nervo epidermico (ENS), condrodiplosia metafisaria di tipo Jansen

Cancro

Osteomalacia indotta dal tumore, calcinosi tumorale familiare

Malattia cardiovascolare

Insufficienza cardiaca, ipertrofia ventricolare sinistra, calcificazione vascolare

Disordini endocrini

Iperparatiroidismo primario, iperparatiroidismo secondario

Malattie renali

Malattia renale cronica (CKD), malattia renale cronica-minerale e disturbo osseo (CKD-MBD), malattia renale cronica e malattia cardiovascolare, danno renale acuto

Disturbi metabolici

Dislipidemia, diabete di tipo 2, anemia

2) CONTENUTO DEL KIT

CONT	COMPONENTI DEL KIT	QUANTITA'
PLATE	Micropiastra pre-sensibilizzata con anti FGF23 policlonale e cornice per le strip, confezionate in busta di alluminio con dissecante	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x, tappo trasparente	1 x 50 ml
ASYBUF	Tampone di dosaggio, pronto all'uso, tappo rosso	1 x 10 ml
STD	Standard 1-7 (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), FGF23 ricombinate umano in plasma umano, tappo bianco, liofilizzati	7 flaconi
CTRL	Controllo A + B, tappo giallo, liofilizzato, vedere l'etichetta per l'esatta concentrazione dopo ricostituzione	2 flaconi
CONJ	Coniugato (topo monoclonale anti-umano FGF23-HRP), tappo ambra, pronto all'uso	1 x 7 ml
SUB	Substrato (soluzione di TMB), flacone marrone, tappo blu pronto all'uso	1 x 13 ml
STOP	Soluzione di arresto, acido solforico, tappo bianco, pronta all'uso	1 x 7 ml

3) MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

- 1 copripiastra (pellicola di plastica) auto-adesivo
- Foglio di protocollo
- Protocollo Controllo di Qualità
- Manuale d'istruzioni d'uso

4) MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Micropipette di precisione calibrate per volumi di 10-50-100-400 µl e puntali monouso
- Acqua distillata o deionizzata
- Lavatore di micropiastre (consigliato) o, in alternativa, pipetta multicanale o dispensatore
- Frigorifero a 4°C (2-8°C)
- Lettore di micropiastre ELISA con filtri da 450 nm (riferimento da 630 nm)
- Provette EP per la diluizione del campione se è necessaria la pre-diluizione
- Carta millimetrata o software dedicato per il calcolo dei risultati

5) PREPARAZIONE DEL REATTIVI E DEL CAMPIONI

Tutti i reagenti così come forniti nel kit sono stabili a 4°C (2-8°C) fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta di ogni reagente.

Preparazione dei campioni

Raccogliere campioni di sangue venoso utilizzando provette per prelievo di sangue standardizzate. Eseguire la separazione del plasma o del siero mediante centrifugazione secondo le istruzioni del fornitore dei dispositivi di raccolta del sangue. **Analizzare immediatamente i campioni acquisiti o aliquotare e conservare a -25°C o inferiore.** Campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati errati. I campioni sono stabili per almeno quattro cicli di congelamento-scongelo. I campioni devono essere miscelati bene prima dell'analisi. Raccomandiamo duplicati per tutti i valori.

I campioni con valori superiori allo Standard 7 (STD7) possono essere diluiti 1:11 (1+10), ad es. 10 µl di campione + 100 µl di ASYBUF, e testati di nuovo.

Il kit include un tampone di dosaggio sufficiente (ASYBUF) per una diluizione 1:11 di 40 campioni (in duplicato). Ulteriori ASYBUF possono essere ordinati utilizzando cat.no. BI-20700-ASYBUF.

A causa dell'instabilità della molecola FGF23 intatta, i campioni devono essere raccolti, elaborati, aliquotati e conservati a -25°C o meno il più rapidamente possibile.

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com (vedi Validation Data) o il distributore autorizzato locale.

Modalità di ricostituzione dei reattivi:

WASHBUF (Tampone di lavaggio): Diluire il tampone concentrato 1:20 ad es. 50 ml WASHBUF + 950 ml acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nel tampone concentrato, si disciolgono a temperatura ambiente. Il tampone non diluito è stabile a 4°C (2-8°C) fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Il tampone diluito è stabile fino a un mese a 4°C (2-8°C). Utilizzare solo il WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito durante l'esecuzione del dosaggio.

STD (Standard) e CTRL (Controllo): Pipettare 400 µl di acqua deionizzata o distillata in ciascun flacone. La concentrazione esatta è indicata sull'etichetta. Lasciare a riposo per 15 min. a temperatura ambiente (18-24°C). Agitare delicatamente. Standard e controlli ricostituiti sono stabili a -25°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta di ciascun flacone; STDs e CTRLs sono stabili fino a 4 cicli di congelamento-scongelo.

6) PRINCIPIO DEL METODO

Il kit ELISA umano (intatto) FGF23 è un test immunoenzimatico a sandwich che è stato ottimizzato e validato per la determinazione quantitativa di FGF23 intatto in campioni di plasma umano. Il siero e altri tipi di campioni sono compatibili con questo ELISA. Per ulteriori informazioni sulle misurazioni del siero, vedere pagina 6/7 o visitare il nostro sito Web (vedere Dati di convalida).

In una prima fase, standard / controllo / campione e coniugato (topo monoclonale anti-umano FGF23-HRP) vengono pipettati nei pozzetti sensibilizzati con un anticorpo monoclonale ricombinante anti-umano FGF23.

L'FGF23 presente nello standard / controllo / campione si lega all'anticorpo e forma un sandwich con l'anticorpo coniugato anti-umano FGF23-HRP. Mediante lavaggio viene rimosso tutto il materiale non legato aspecifico. In una seconda fase, il substrato (TMB, tetrametilbenzidine) viene dispensato nei pozzetti. Il cambiamento di colore del substrato catalizzato da enzimi è direttamente proporzionale alla quantità di FGF23 intatto presente nel campione. Questo cambiamento di colore è rilevabile con un lettore di micropiastre ELISA. Viene costruita una curva dose-

risposta dell'assorbanza (densità ottica, OD a 450 nm) utilizzando i valori ottenuti dagli standard rispetto alla concentrazione standard. La concentrazione di FGF23 intatto nel campione è calcolata direttamente dalla curva dose-risposta. Vedi capitolo 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* delle istruzioni in lingua inglese.

7) PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-24°C) prima dell'uso.
Segnare sul foglio del protocollo la posizione per STD/CTRL/AMPIONE (Standard/Controllo/Campione).
Togliere le strisce della micropiastra dalla confezione. Conservare le strip inutilizzate con il dissecante a 4°C (2-8°C) nella confezione e sono stabili fino alla data di scadenza.
1. Pipettare 50 µl di STD/CTRL/AMPIONE (Standard/Controllo/Campione) in duplicato nei corrispondenti pozzetti.
2. Aggiungere 50 µl di CONJ (coniugato, tappo color ambra) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
3. Coprire bene la piastra e incubare per 3 ore a temperatura ambiente (18-24°C), al buio.
4. Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µl di WASHBUF (Tamponi di lavaggio) diluito, togliere il WASHBUF restante picchiettando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
5. Aggiungere 100 µl di SUB (Substrato, tappo blu) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (18-24°C) al buio.
7. Aggiungere 50 µl di STOP (Soluzione di stop) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
8. Misurare immediatamente l'assorbanza a 450 nm con filtro di riferimento a 630 nm, se disponibile.

8) CALCOLO DEL RISULTATI

Leggere la densità ottica (OD) di tutti i pozzetti con un lettore di micropiastre utilizzando la lunghezza d'onda 450 nm (correzione con lunghezza d'onda 630 nm). Costruire la curva standard dai valori OD degli standard. Per l'elaborazione dei dati, utilizzare un programma computerizzato o carta millimetrata. Calcolare la concentrazione dei campioni da questa curva standard. Il test è stato valutato con l'interpolazione a 4 parametri. Sistemi di interpolazione differenti devono essere convalidati dagli utilizzatori. Se necessario, la concentrazione di pg/ml può essere convertita in pmol/l applicando un fattore di conversione (1 pg/ml = 0,038 pmol/l; MW: 26 kDa).

Tenere conto dei fattori di diluizione.

Esempio curva tipica:

Vedi capitolo 8) *CALCULATION OF RESULTS* in lingua inglese.

Il protocollo di controllo di qualità (QC) in dotazione con il kit mostra i risultati del controllo di qualità versione finale per ciascun lotto. I dati per OD ottenuti possono variare a causa di vari fattori e / o per la normale diminuzione dell'intensità del segnale durante la lettura. Tuttavia, ciò non influisce sulla validità dei risultati finché un OD di 1,50 o superiore viene ottenuto per l'STD con la più alta concentrazione e i valori dei CTRL sono nel range.

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Vedi capitolo 9) *ASSAY CHARACTERISTICS* delle istruzioni in lingua inglese.

Questo ELISA è ottimizzato e validato per campioni di plasma umano. Il siero e altri tipi di campioni sono compatibili con questo ELISA. Per ulteriori informazioni sulle caratteristiche del dosaggio si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com (vedi Validation Data) o il distributore autorizzato locale.

10) PRECISIONE

Intra-saggio: 2 campioni a concentrazioni note di iFGF23 sono stati dosati 3 volte.

Inter-saggio: 2 campioni a concentrazioni note di FGF23 sono stati dosati 9 volte da 2 operatori diversi con 2 kit di lotto differente.

Intra-saggio (n=3)	Campione 1	Campione 2	Inter-saggio (n=9)	Campione 1	Campione 2
Media (pg/ml)	99	800	Media (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	8.4	10.2	SD (pg/ml)	5.9	15.2

CV (%)	8	1	CV (%)	6	2
--------	---	---	--------	---	---

11) CONSIDERAZIONI TECNICHE

- Non mescolare o sostituire i reattivi con altri da lotti o fonti diverse.
- Non scambiare i tappi di flaconi diversi e non usare reattivi da lotti differenti.
- Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. Proteggere i reattivi dalla luce solare diretta.
- La soluzione del substrato deve rimanere incolore fino alla dispensazione nei pozzetti.
- Per avere risultati accurati è necessario chiudere ermeticamente le piastre con il copripiastre adesivo.
- Quando si agitano i reattivi evitare la formazione di schiuma.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti di origine umana sono stati dosati per la determinazione di HIV-Ab, HCV-Ab e HBsAg e sono stati trovati negativi. Si raccomanda di manipolare e di eliminare i reattivi come potenzialmente infettivi. I reagenti liquidi contengono una percentuale $\leq 0,1\%$ di Proclin 950 come conservante. Evitare il contatto con cute e mucose. Il Proclin 950 non è tossico alle concentrazioni usate in questo kit. Può causare reazioni cutanee allergiche – evitare contatti con cute o occhi.

- Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o utilizzare cosmetici quando si utilizzano reattivi per diagnostici.
- Quando si manipolano i reattivi utilizzare sempre guanti monouso.
- L'acido solforico è irritante per occhi e cute. Evitare il contatto con cute e mucose; il prodotto è irritante. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua corrente.

13) BIBLIOGRAFIA

Vedi capitolo 13) *LITERATURE* delle istruzioni in lingua inglese.

1) INTRODUCCIÓN

El FGF23 (factor de crecimiento fibroblástico 23) es un miembro de la familia de factores de crecimiento fibroblástico y controla la homeostasis del fosfato y de la vitamina D. La proteína completa consta de 32 kDa con 251 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 24 aminoácidos. La región N-terminal de FGF23 se separa de la región C-terminal mediante una escisión proteolítica entre arginina179 y serina180. Por eso, las formas principales de FGF23 presentes en circulación en humanos son el factor FGF23 hormonalmente intacto y fragmentos inactivos N-terminal y C-terminal. El FGF23 se une al receptor 1c de FGF con su región N-terminal, mientras que con la región C-terminal interactúa con el co-receptor α -Klotho que le confiere una alta afinidad de unión al receptor. FGFR1c y α -Klotho se expresan en la nefrona distal y en la glándula paratiroidea. La señalización independiente de co-receptor de FGF23 se ha descrito también para otros FGFRs, que se expresan en una gran variedad de tejidos. El FGF23 es secretado principalmente por los osteocitos en el hueso.

Áreas de interés:

Enfermedades Óseas:

Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD), raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo (ARHR), raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH), síndrome de McCune-Albright / displasia fibrosa, raquitismo hipofosfatémico e hiperparatiroidismo (HRHPT), raquitismo inducido por fármacos / osteomalacia, hiperfosfatemia, síndrome de hiperostosis-hiperfosfatemia, displasia fibrosa, neurofibromatosis, displasia osteoglofónica (OGD), síndrome del nevus sebáceo lineal (LNSS)/síndrome del nevus epidérmico (ENS), condrodisplasia metafisaria de tipo Jansen.

Cáncer:

Osteomalacia inducida por tumor, calcinosis tumoral familiar

Enfermedad Cardiovascular:

Fallo cardíaco, hipertrofia del ventrículo izquierdo, calcificación vascular.

Desórdenes endocrinos:

Hiperparatiroidismo primario, hiperparatiroidismo secundario.

Enfermedad Renal:

Enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal crónica-desorden mineral y óseo (CKD-MBD), enfermedad renal crónica y enfermedad cardiovascular, daño renal agudo.

Desórdenes Metabólicos:

Dislipidemia, diabetes tipo 2, anemia

2) CONTENIDO DEL KIT

CONTENIDO	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLATE	Tiras de microplaca en soporte, recubiertas con recombinante anticuerpo monoclonal de ratón anti-FGF23 humano. Embalaje de bolsa de aluminio con desecante.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado concentrado 20x, tapón transparente	1 x 50 ml
ASYBUF	Tampón de ensayo, tapón rojo, listo para usar	1 x 10 ml
STD	Estándares 1-7 (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 pg/ml), recombinantes humanos FGF23 en plasma humano, tapones blancos, liofilizados	7 viales
CTRL	Controles A + B, tapones amarillos, liofilizados (concentración exacta en las etiquetas de los viales)	2 viales
CONJ	Conjugado (anticuerpo monoclonal de ratón anti-FGF23 humano - HRP), tapón ámbar, listo para usar	1 x 7 ml
SUB	Substrato (Solución de TMB), bote ámbar y tapón azul, listo para usar.	1 x 13 ml
STOP	Solución de parada, tapón blanco, lista para usar.	1 x 7 ml

3) MATERIAL ADICIONAL INCLUIDO EN EL KIT

- 1 tiras adhesivas de plástico
- Hoja con el esquema de la placa
- Protocolo QC
- Manual de instrucciones

4) MATERIAL Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar 10 µl, 50 µl, 100 µl, 400 µl y puntas desechables.
- Agua destilada o desionizada.
- Se recomienda lavador de placas para lavar, como alternativas pipetas multicanal o un dispensador.
- Frigorífico a 4°C (2-8°C).
- Lector ELISA para absorbancias de 450 nm (con longitud de ondas de corrección de 630 nm).
- Tubos Eppendorf para pre-dilución (si se requiere) y dilución de muestras.
- Papel gráfico o software para el cálculo de resultados.

5) REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRA

Todos los reactivos en el kit son estables a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta de cada reactivo.

Preparación/dilución de muestra:

Recoger muestras de sangre venosa utilizando tubos de recogida de muestra estandarizados para suero o plasma. Separe el plasma o suero mediante centrifugación de acuerdo a las instrucciones del fabricante de los tubos de recogida. **Mida las muestras inmediatamente o haga alícuotas y almacene a temperatura de -25°C o inferior.** Las muestras lipémicas o hemolizadas pueden dar resultados erróneos. Las muestras pueden someterse a un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras deberán ser mezcladas correctamente antes de cada ensayo. Se recomienda realizar las muestras por duplicado.

Las muestras en las que se obtengan valores superiores a la lectura del estándar 7, pueden diluirse 1:11 (1+10), por ejemplo, 10 µl de muestra + 100 µl ASYBUF, y medir de nuevo.

El kit incorpora tampón de ensayo suficiente (ASYBUF) para una dilución 1:11 de 40 muestras. ASYBUF adicional se puede pedir de forma bajo petición (cat.no. BI-20700-ASYBUF).

Debido a la poca estabilidad de la molécula de FGF23 intacto, las muestras deben recogerse, procesarse, alícuotarse y almacenarse a -25°C o menos lo antes posible.

Para información adicional sobre la estabilidad de las muestras por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com (ver Validation Data) o contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail info@bmgrp.com o por teléfono +43/1/29107-45.

Reconstitución/ Manipulación:

WASHBUF (Tampón de lavado): Diluir el concentrado 1:20, ej. 50 ml WASHBUF + 950 ml de agua destilada. Los cristales en el tampón concentrado pueden disolverse a temperatura ambiente. El tampón sin diluir es estable a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta. Si el WASHBUF está diluido, se mantiene estable durante un periodo de un mes, como máximo, a 4°C (2-8°C). Utilizar solo el WASHBUF diluido para el ensayo.

STD (Estándares) y CTRL (Controles): Pipetear 400 µl de agua destilada o desionizada en cada vial. Dejar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 15 min. Agitar en vortex. Los estándares y controles reconstituidos son estables a -25°C hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta. STDs y CTRLs pueden someterse a un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación

6) PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ELISA del FGF23 (intacto) humano es un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich optimizado y validado para la determinación cuantitativa de FGF23 intacto en muestras de plasma humano. Suero y otros tipos de muestra son compatibles con este ELISA. Para información adicional sobre medidas en suero, por favor vaya a las páginas 6-7 (ver "Validación de Datos") o visite nuestro sitio web.

En un primer paso, se pipetea en los pocillos de la microplaca estándares/muestras/controles y el conjugado (anticuerpo monoclonal de ratón anti-FGF23 humano-HRP). Los pocillos están pre-recubiertos con un anticuerpo monoclonal recombinante anti-FGF23 humano. El FGF23 presente en estándares/muestras/controles se une al anticuerpo que recubre los pocillos y forma un sándwich con el anticuerpo conjugado anti-FGF23 humano- HRP. A continuación, se lleva a cabo un lavado en el que se elimina todo el material no unido al pocillo.

En un segundo paso, se pipetea en todos los pocillos el sustrato (TMB, tetrametilbenzidina). El cambio de color que se produce debido a la acción catalizadora de la enzima es directamente proporcional a la cantidad de FGF23 intacto presente en la muestra. Este cambio de color es detectable utilizando un lector estándar de microplacas. Se debe generar una curva dosis-respuesta de absorbancia (densidad óptica, OD a 450 nm) utilizando los valores obtenidos de los estándares. La concentración de FGF23 intacto en cada muestra se determina directamente a partir de esta curva dosis-respuesta.

Ver capítulo 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

7) PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente (18-24°C) antes de su utilización en el ensayo.
Marcar la posición de STD/CTRL/Muestra (Estándar/Control/Muestra) en la hoja del esquema de la placa.
Sacar las tiras de la bolsa de aluminio. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio con desecante a 4°C (2-8°C). Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.
1. Pipetear 50 µl de STD/CTRL/Muestra (Estándar/Control/Muestra) en duplicado en sus pocillos correspondientes.
2. Añadir 50 µl de CONJ (conjugado, tapón ámbar) en cada pocillo, mezclar suavemente con movimiento circular.
3. Tapar la placa con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante 3h a temperatura ambiente (18-24°C) y en oscuridad.
4. Aspirar y lavar los pocillos 5 veces con 300 µl del WASHBUF diluido (buffer de lavado, tapón transparente). Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
5. Añadir 100 µl de SUB (sustrato, tapón azul) a cada pocillo. Agitar suavemente con movimiento circular.
6. Tapar la placa con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante 30 min. a temperatura ambiente (18-24°C) y en oscuridad.
7. Añadir 50 µl de solución STOP (solución de parada, tapón blanco) en cada pocillo. Agitar suavemente.
8. Medir la absorbancia inmediatamente a 450 nm, con corrección a 630 nm como referencia, si es posible.

8) CÁLCULO DE RESULTADOS

Leer la densidad óptica (OD) de todos los pocillos en un lector de placas usando una longitud de onda de 450 nm (corrección de longitud de onda a 630 nm). Realizar una curva estándar a partir de los valores de las absorbancias de los estándares. Utilizar un programa informático o un papel de representación gráfica. Obtener el valor de la concentración de la muestra a partir de la curva estándar. Si se requiere, las concentraciones en pg/mL pueden convertirse en pmol/L aplicando un factor de conversión (1 pg/ml = 0.038 pmol/l; MW: 26 kDa). Se deben de considerar distintos factores de dilución. El ensayo fue evaluado con un algoritmo de 4 PL. Los distintos métodos de ajuste de curvas empleados deben ser evaluados por el usuario.

Ejemplo de típica curva de calibración:

Ver capítulo 8) *CALCULATION OF RESULTS* de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

El certificado del control de calidad (QC) que se suministra con el kit muestra los resultados del control de calidad final que se realiza con cada lote. Los datos de la densidad óptica obtenidos por los clientes pueden diferir debido a diversos factores y/o debido a una disminución obvia de la intensidad de la señal a lo largo de la vida media del producto. Sin embargo, esto no afecta a la validez de los resultados siempre que se obtenga, como mínimo, un valor de 1,5 para la densidad óptica del estándar de concentración más elevada y los controles estén dentro de su rango de medida (para ver los rangos de los controles ver las etiquetas de sus viales).

9) CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Ver capítulo 9) *ASSAY CHARACTERISTICS* de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

Este ELISA está optimizado y validado para muestras de plasma humano. Suero y otro tipo de muestras son compatibles con este ELISA.

Para más información sobre las características del ensayo visite, por favor, nuestra página web www.bmgrp.com (ver Validation Data) o contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail info@bmgrp.com o por teléfono +43/1/29107-45.

10) PRECISION

Intra-ensayo: Para valorar la precisión en el mismo ensayo, se analizaron 3 replicados de 2 muestras de concentraciones conocidas con un mismo lote, por un mismo operador.

Inter-ensayo: Para valorar la precisión de un ensayo a otro, se analizaron 2 muestras de concentraciones conocidas en 9 ensayos con 2 lotes de kit diferentes por 2 operadores distintos.

Intra-ensayo (n=3)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pg/ml)	99	800
SD (pg/ml)	8.4	10.2
CV (%)	8	1

Inter-ensayo (n=9)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pg/ml)	103	803
SD (pg/ml)	5.9	15.2
CV (%)	6	2

Información detallada sobre el ensayo de FGF23 (C-terminal) ELISA, por ejemplo, datos de validación, comparaciones de matrices y datos de estabilidad, está disponible en la página web: www.bmgrp.com (ver Validation Data).

11) OBSERVACIONES TÉCNICAS

- No mezclar ni sustituir reactivos procedentes de diferentes lotes o fabricantes.
- No mezclar tapas y tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- Las soluciones de sustrato deberían mantenerse incoloras hasta que se añadan a la microplaca.
- Para asegurar unos resultados más exactos, es necesario tapar adecuadamente la placa con el papel adhesivo durante los pasos de incubación.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.

12) PRECAUCIONES

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados para detectar la presencia de anticuerpos de VIH y VCH y al antígeno de superficie de la Hepatitis B; el resultado fue negativo. Sin embargo, deberían manipularse y desechar como si se tratara de material potencialmente infeccioso.

Todos los reactivos líquidos contienen Proclin 950 al 0,01% como conservante. Evitar el contacto con la piel o con las membranas mucosas. La Proclin 950 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Como puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel o los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas. Puede presentarse irritación. Si tiene lugar contacto alguno, enjuagar con abundante agua.

13) BIBLIOGRAFÍA

Ver capítulo 13) *LITERATURE* de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

Notes/Notizen:

Notes/Notizen:

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchcode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI- 20700 FGF23 INTACT

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-24°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 50 µl STD/CTRL/SAMPLE (standard/control/sample) into respective wells.
- Step 2) Add 50 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well. Swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-24°C), in the dark.**
- Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by strongly tapping the plate against a paper towel.
- Step 5) Add 100 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well. Swirl gently.
- Step 6) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-24°C), in the dark.**
- Step 7) Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
- Step 8) Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.