

TSEKKI

UniQ™

# ICTP<sub>EIA</sub>

**C-terminální telopeptid kolagenu typu I**  
**Enzymoimunoanalytické stanovení**  
Kat.č.05892

**Návod k použití soupravy**

**Květen 2007**

Určený účel použití	3
Klinický význam ICTP	3
Princip testu	4
Reagencie	5
Přístroje	7
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	7
Pracovní postup	7
Omezení metody	8
Zajištění jakosti	9
Výpočet výsledků	9
Referenční intervaly	10
Analytické parametry měření	11
Literatura (viz originální příbalová informace)	



**Orion Diagnostica**

*Výrobce:*

Orion Diagnostica Oy  
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland  
Tel. +358-10-4261  
Fax +358-10-426 2794  
www.oriondiagnostica.fi



**CE**

## Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

IVD

Použitelné do



Enzymový konjugát

CONJ ENZ

Antisérum

Ab ICTP

Stopovací roztok

SOLN STOP

Katalogové číslo

REF

Teplotní rozmezí



Koncentrace kalibrátoru

CAL 0

Koncentrát promývacího roztoku

BUF WASH 12.5X

Substrát

SUBS TMB

Číslo šarže

LOT

Viz návod k použití



Kontrola

CONTROL

## **URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ**

Orion Diagnostica UniQ ICTP EIA je kvantitativní nzymoimunoanalytický test určený pro *in vitro* stanovení koncentrací karboxyterminálního křížově provázaného telopeptidu kolagenu typu I (ICTP) v lidském séru.

## **KLINICKÝ VÝZNAM ICTP**

Kolagen typu I je nejrozšířenějším typem kolagenu v těle a je jediným typem kolagenu, který se vyskytuje v mineralizované kosti, kde představuje více než 90 % organické kostní hmoty. Kolagen typu I se dále nachází v řídkých pojivových tkáních společně s dalšími typy kolagenů, jako je typ III, V a VI. V těchto tkáních je podíl kolagenu typu I nejvyšší.

Kolagen typu I se vyskytuje v podobě vláken, jejichž struktura vykazuje určité variace v závislosti na typu tkáně. V kosti jsou molekuly kolagenu I provázány prostřednictvím tří hydroxylysinových a lysinových zbytků nebo jejich derivátů, které vytvářejí fluorescentní cyklickou pyridinolinovou strukturu spojující tři různé polypeptidové řetězce kolagenu dohromady. V řídké pojivové tkáni, jako je kůže, není hlavní zralá provázaná struktura kolagenu I fluorescentní a obsahuje jako jeden z aminokyselinových zbytků histidin.

ICTP je karboxyterminální telopeptidový úsek kolagenu I provázaný prostřednictvím pyridinolinových vazebných spojek a uvolňovaný během degradace kolagenu typu I. Tento peptid se nachází v krvi ve formě, která je imunochemicky intaktní. Předpokládá se, že jeho vznik souvisí s resorpcí kosti a degradací řídké pojivové tkáně. Nedávno bylo zjištěno, že antigen ICTP je produkován činností matrixových proteináz, což jsou enzymy působící při degradaci tkání za různých patologických podmínek.

Zvýšené koncentrace ICTP v séru se vyskytují při stavech spojených se zvýšenou osteolýzou, tedy při stavech jako je mnohočetný myelom, osteolytická metastáza, revmatoidní artritida a znehybnění. Protože ICTP není produkován za fyziologických podmínek při degradaci kosti zprostředkované katepsinem K, jeho koncentrace je méně ovlivněna např. menopauzou.

## **PRINCIP TESTU**

Test Orion Diagnostica UniQ ICTP EIA je založen na technice kompetitivní enzymoimunoanalýzy. Znamé množství peroxidázou značeného ICTP a neznámé množství neznačeného antigenu soutěží o vazbu na omezený počet vysoce afinitních vazebných míst primární protilátky. K sekundární protilátce, připravené proti primární protilátce a navázané na jamky mikrotitrační destičky, se váže komplex antigen-protilátka, což dovoluje praktickou separaci navázaného a volného antigenu.

Po odmytí volného antigenu je množství značeného ICTP v reakční směsi nepřímo úměrné ICTP ve vzorku. Po inkubaci se substrátem, který produkuje barevné látky, je proměřeno množství značeného ICTP. Koncentrace v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

## REAGENCIE

### Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
<b>ICTP EIA MICROTITRE PLATE:</b> ICTP EIA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKA: 96 jamek potažených kozí protilátkou proti králičí protilátce	Stripy, 12 x 8 jamek	Při teplotě 2 – 8°C v původním obalu do data expirace. Po použití obal vždy pečlivě uzavřete.
<b>ICTP EIA ENZYME CONJUGATE:</b> ENZYMOVÝ KONJUGÁT ICTP EIA: Připraven k použití. Enzymovým konjugátem ICTP EIA je peroxidázou značený ICTP. Červené barvivo.	1 lahvička 7 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP EIA ANTISERUM:</b> ANTISÉRUM ICTP EIA: Připraveno k použití. Králičí antisérum. Modré barvivo.	1 lahvička 7 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP EIA CALIBRATORS:</b> KALIBRÁTORY ICTP EIA: Připraven k použití. Koncentrace ICTP 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 a 50 µg/l ve fosfátovém tlumivém roztoku. <i>Kalibrováno proti interní master kalibrační soupravě.</i>	7 lahviček 0,5 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP EIA CONTROLS 1&amp;2:</b> ICTP EIA KONTROLY 1&2: Lyofilizované, v lidském séru. Očekávané hodnoty jsou uvedeny na zvláštním listě.	2 lahvičky  Rekonstituovat 0,5 ml destilované vody	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.  Po rekonstituci 1 týden při teplotě 2 – 8°C. Déle skladujte při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.
<b>ICTP EIA WASH CONCENTRATE:</b> ICTP EIA KONCENTRÁT PROMÝVACÍHO ROZTOKU: 12,5 x koncentrovaný	1 lahvička 80 ml Naředit do objemu 1000 ml destilovanou vodou.	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Po naředění 7 týdnů při teplotě 2 – 25°C.
<b>ICTP EIA SUBSTRATE:</b> ICTP EIA SUBSTRÁT: Připraven k použití. 3,3',5,5' - tetrametylbendidin ve vodném pufru.	1 lahvička 17 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP EIA STOPPING SOLUTION:</b> ICTP EIA STOPOVACÍ ROZTOK: Připraven k použití. 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 lahvička 13 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.

## **Upozornění a bezpečnostní opatření**

**VAROVÁNÍ 1: Pro diagnostické použití *in vitro*.** Není určeno pro interní nebo externí použití u lidí nebo u zvířat. Používejte pouze součásti jedné soupravy. Nemíchejte součásti s navázanou protilátkou z různých souprav (krabic). Reagencie nepoužívejte po expirační době soupravy.

Nepipetujte ústy. Při práci s radioaktivním materiálem je zakázáno jíst, pít nebo kouřit. Používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Po skočení práce s těmito látkami si důkladně umyjte ruce. Ukápnutý materiál je nutno okamžitě omýt velkým množstvím vody. Materiály použité k čištění by měly být likvidovány dle předpisů.

**VAROVÁNÍ 2:** Se všemi vzorky pacientů je nutno pracovat jako s **potenciálně infekčním** materiálem. Výchozím materiálem pro kalibrátory je lidská krev, která byla testována licencovanými reagencemi a shledána negativní na HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátky. Vzhledem k tomu, že žádný známý test nemůže dát jistotu, že materiál není infekční, pracujte s ním jako s materiálem potenciálně infekčním.

**VAROVÁNÍ 3:** Stopovacím roztokem je 0,5 M kyselina sírová. Je korozivní, pracujte s ní opatrně.

## **PŘÍSTROJE**

K měření je třeba použít třepačku a promývačku na mikrotitrační destičky a fotometr schopný měření absorbancí mikrotitračních destiček při vlnové délce 450 nm. Doporučuje se systematická kalibrace přístroje. Podrobnosti týkající se zapojení, použití, údržby a kalibrace najdete v návodu k obsluze dodávaném výrobcem přístroje. Rychlost třepání by měla být alespoň 600 rpm.

## **MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU**

Ačkoliv jsou pro zpracování doporučovány vzorky sér, soupravu lze rovněž použít pro vzorky EDTA plazmy. Nepoužívejte vzorky citrátové plazmy nebo heparin plazmy. Vzorky sér se mohou skladovat až 5 dnů při teplotě 2...8°C. Pro dlouhodobější skladování se doporučuje teplota nejméně -20°C. Je třeba vyhnout se opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku.

## PRACOVNÍ POSTUP

### Potřebný materiál, který není součástí soupravy:

MIKROPIPETY pro přesné dávkování 50 $\mu$ l, 100  $\mu$ l a 500  $\mu$ l  
TŘEPAČKA MIKROTITRAČNÍCH DESTIČEK  
PROMÝVAČKA MIKROTITRAČNÍCH DESTIČEK  
FOTOMETR PRO MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY  
BUNIČITÁ VATA  
DESTILOVANÁ VODA

### Rekonstituce reagensů

**Kontroly.** Všechny lahvičky s kontrolami před otevřením vytemperujte na laboratorní teplotu (18 - 25°C). Rekonstituuje přidávkem 500 $\mu$ l destilované vody do každé lahvičky. Zavřete víčko a důkladně promíchejte jemným kroužením nebo převrácením, zamezte přitom tvorbě pěny. Před použitím nechte stát 30 minut.

**Koncentrát promývacího roztoku.** Koncentrát promývacího roztoku naředěte do 1000 $\mu$ l (80 $\mu$ l + 920 $\mu$ l) destilovanou vodou..

### Podrobný popis postupu

1. **Temperujte** všechna činidla, vzorky a kontroly na laboratorní teplotu (18 – 25 °C) alespoň 30 minut před použitím.
2. Stripy, které nebudete používat, odlomte, vraťte do původního obalu a pečlivě uzavřete.
3. Do odpovídajících jamek mikrotitrační destičky **napipetujte** po 50  $\mu$ l kalibrátorů, kontrolních vzorků a vzorků sér pacientů. Pracujte v duplikátech. Dvě jamky rezervujte pro blank substrátu.
4. Do všech jamek, kromě jamek pro blank, **přidejte** 50  $\mu$ l enzymového konjugátu (červený).
5. Do všech jamek, kromě jamek pro blank, **napipetujte** 50  $\mu$ l roztoku ICTP protilátky (modrý). Do všech jamek je nutno antisérum napipetovat během 3 minut. Doporučujeme použít elektronický dávkovač nebo multikanálovou pipetu.
6. **Inkubujte** na třepačce 2 hodiny při teplotě 18 - 25°C. Použijte **rychlost** 600 – 1000 rpm.
7. Všechny stripy 4x **promyjte** promývacím roztokem na promývačce mikrotitračních destiček. Promývací roztok musí být dávkován nad jamkami a doporučuje se použít 600  $\mu$ l promývacího roztoku na jamku a cyklus (přeplňovací mód/overflow mode), jinak se požaduje použít až 8 promývacích cyklů. Po promývání odstraňte z jamek všechnu zbytkovou vlhkost jemným poklepáním stripů do buničité vaty. Stojánek na stripy mikrotitračních destiček držte jemně na jeho

delší straně, aby z něho stripy nevypadly. **Pozn. Pro správné provedení testu má pečlivé promývání zásadní význam.**

8. Do všech jamek **přidejte** 100 µl ICTP substrátu.
9. **Inkubujte** na třepačce 30 minut při teplotě 18 - 25°C.
10. Reakci **zastavte** přidávkem 100 µl stopovacího roztoku do všech jamek. K promíchání reakční směsi **třepete** 15-30 sekund.
11. **Změřte** absorbance všech jamek pomocí fotometru mikrotitračních destiček při vlnové délce 450 nm během 10 minut.

## **OMEZENÍ METODY**

ICTP hodnoty podléhají diurnálnímu kolísání s vyššími hodnotami v noci. Při nedostatečnosti ledvin (je-li rychlost glomerulární filtrace 50 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a nižší) dochází ke zvýšení koncentrací ICTP v krvi. Zdá se, že játra se metabolismu sérového antigenu ICTP neúčastní. ICTP by nemělo být jediným parametrem pro stanovení diagnózy a léčby, ale měl by být podpořen dalšími klinicky relevantními daty.

## **ZAJIŠTĚNÍ JAKOSTI**

Všem klinickým laboratořím je v rámci interního programu pro zajišťování jakosti doporučováno provádět stanovení kontrolních vzorků o hodnotách koncentrací při horní i při dolní hranici rozsahu stanovení pro sledování kvality provádění postupu. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní přijatelný rozsah vnitřních kontrol používaných v dané laboratoři. Střední hodnota rozsahu kontrolních vzorků má spadat do přijatelného rozsahu uváděného výrobcem. Pro stanovení hodnot kontrolních vzorků se doporučuje použít soupravy nejméně ze dvou různých šarží.

## VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Při automatickém výpočtu výsledků doporučujeme použít spline funkci. Výsledky lze odečíst manuálně z kalibrační křivky vynesené v semilogaritmických souřadnicích.

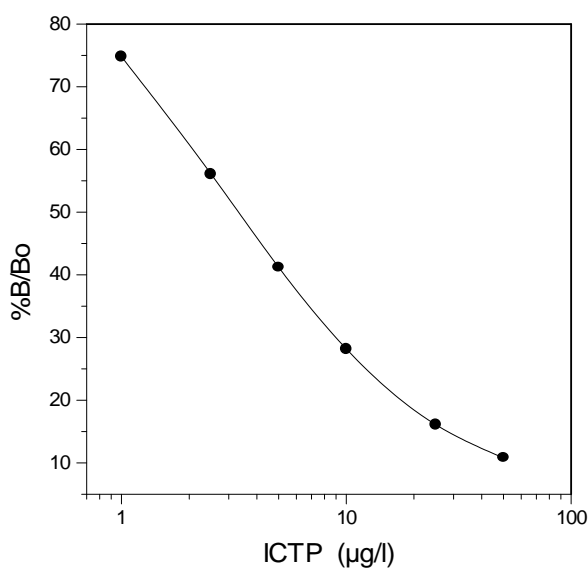
**Vypočtete** střední hodnotu absorbancí pro všechny kalibrátory, vzorky a kontroly.

**Vypočtete** % (B/B<sub>0</sub>) podle vzorce:

$$\% (B/B_0) = \frac{(\text{absorbance kalibrátoru nebo vzorku} - \text{blank}) \times 100}{(\text{absorbance nulového kalibrátoru} - \text{blank})}$$

**Vyneste** kalibrační křivku na semilogaritmický papír z hodnot % (B/B<sub>0</sub>) na ose **y** a odpovídajících koncentrací ICTP (μg/l) na ose **x**.

**Odečtete** koncentrace ICTP v neznámých vzorcích z kalibrační křivky.



Jamka	Průměr absorbance	Absorbance blanku	%B/B <sub>0</sub>	ICTP (μg/l)
Blank	0.072			
Kalibrátor 0	1.857	1.785		
Kalibrátor 1.0	1.407	1.335	74.8	
Kalibrátor 2.5	1.073	1.001	56.1	
Kalibrátor 5.0	0.808	0.736	41.2	
Kalibrátor 10	0.575	0.503	28.2	
Kalibrátor 25	0.360	0.288	16.1	
Kalibrátor 50	0.264	0.192	10.8	
Neznámý vzorek	0.818	0.746	41.8	4.8
Neznámý vzorek	0.484	0.412	23.1	13.9

Obr. 1 – Typická kalibrační křivka  
Str.8 originální příbalové informace

Tabulka 1 Výpočet výsledků při použití  
typických údajů. Příklad.

## REFERENČNÍ INTERVALY

Z důvodů etnické, dietární a věkové variability nemusí tyto referenční hodnoty odpovídat celé populaci. Každá laboratoř by si proto měla vytvořit vlastní rozmezí referenčních hodnot.

Byly naměřeny hodnoty ICTP u očividně zdravých dospělých osob ve věku 19-74 let pomocí soupravy ICTP EIA. Ke kalkulaci referenčního rozmezí pro horní a dolní mez bylo použito neparametrické metody doporučené IFCC.

**Tabulka 2** Referenční hodnoty koncentrací ICTP v séru

	<b>Ženy</b>	<b>Muži</b>
Počet sledovaných osob	146	127
Průměr	2.6 µg/l	2.7 µg/l
Referenční interval*	<b>1.6 - 4.2 µg/l</b>	<b>1.5 - 4.3 µg/l</b>
0,90 intervaly spolehlivosti		
pro dolní referenční mez	1.5 - 1.8 µg/l	1.2 - 1.6 µg/l
pro horní referenční mez	3.8 - 5.2 µg/l	3.9 - 5.3 µg/l

\* Referenční interval = 0,025 a 0,975 fraktilů.

## ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Níže uvedené výsledky byly získány v Orion Diagnostica a představují typická analytická data.

### Měřicí rozmezí

1-50 µg/l.

### Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnoty nulového kalibrátoru, je přibližně 0,3 µg/l.

### Ředění

Vzorky s vysokou koncentrací ICTP mohou být ředěny fyziologickým roztokem nebo nulovým kalibrátorem ze soupravy.

### Metoda standardního přídávku (recovery)

Známa množství ICTP byla přidána k pěti patientským sérům, které obsahovaly 3,4-6,2 µg/l ICTP. Standardní přídávky se pohybovaly v rozmezí 88 – 95% s průměrnou hodnotou 93%.

### Preciznost (precision)

Pro stanovení variací v rámci testu (intra-assay) a mezi testy (inter-assay) byly testovány vzorky sér o různých koncentracích ICTP antigenu.

**Tabulka 3.** Intra-assay a inter-assay přesnost

Intra-assay preciznost 10 replikátů			Inter-assay preciznost 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (μg/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (μg/l)	CV (%)
1	2.9	11.3	6	3.2	6.4
2	4.7	13.2	7	4.8	7.6
3	5.6	8.1	8	7.1	7.5
4	13.7	8.9	9	13.1	9.8
5	26.4	7.6	10	28.2	6.4

### Interferující látky

Sérový bilirubin do koncentrace < 340 μmol/l, hemoglobin do koncentrace < 5 g/l a triglyceridy do koncentrace < 30 g/l neinterferují s měřením.

### Specifická

Antigení determinanta protilátky leží uvnitř dvou hydrofóbních, na fenylalanin bohatých sekvencí trivalentně provázaného ICTP. Trivalentní provázání je nezbytné, protože bivalentně provázané nebo monovalentní peptidy, obsahující pouze jednu na fenylalanin bohatou sekvenci, vykazují nízkou imunoreakci. ICTP EIA antisérum křížově nereaguje s antigeny používanými v dalších testech pro kolageny UniQ.

# UniQ™ ICTP EIA

## C-terminální telopeptid kolagenu typu I

### Enzymoimunoanalytické stanovení

#### Kat.č. 05892

### Obsah soupravy (96 testů)

*ICTP EIA microtitre plate:* ICTP EIA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKA  
*ICTP EIA enzyme conjugate:* ICTP EIA ENZYMOVÝ KONJUGÁT  
*ICTP EIA antiserum:* ICTP EIA ANTISÉRUM  
*ICTP EIA calibrators:* ICTP EIA KALIBRÁTORY  
*ICTP EIA controls:* ICTP EIA KONTROLY  
*ICTP EIA substrate:* ICTP EIA KONCENTRÁT PROMÝVACÍHO ROZTOKU  
*ICTP EIA stopping solution:* ICTP EIA STOPOVACÍ ROZTOK

### Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v µl)

	Blank	Kalibrátor	Kontrolní séra a séra pacientů
Napipetujte vzorek		50	50
<b>Napipetujte enzymový konjugát (červený)</b>		50	50
<b>Napipetujte antisérum (modré)</b>		50	50
<b>Inkubujte na třepačce 2 hodiny při 18-25°C</b>	x	x	x
Promyjte 4x	x	x	x
<b>Napipetujte substrát</b>	100	100	100
<b>Inkubujte na třepačce 30 minut při 18-25°C</b>	x	x	x
<b>Napipetujte stopovací roztok</b>	100	100	100
<b>Jemně promíchejte</b>	x	x	x
<b>Měřte absorbance při 450 nm</b>	x	x	x

US Patent č.5.538.853; EP Patent č. 505210 B1; JP Patent č. 2886728

UniQ je registrovaná známka firmy Orion Diagnostica Oy

TSEKKI 05892-CZ04

Zastoupení výrobce v ČR:

Orion Corporation Orion Diagnostica-organizační složka  
Kýkalova 1, 146 20 Praha 4  
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz