

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ У СЕЧІ С-КІНЦЕВОГО ТЕЛОПЕПТИДУ, ЩО УТВОРЮЮТЬСЯ ПРИ ДЕГРАДАЦІЇ КОЛАГЕНУ II ТИПУ (СТХ-II)

### AC-10F1, Urine CartiLaps (CTX-II) EIA

Каталог. № : AC-10F1

Кількість : 96

Виробник : IDS (Великобританія)

Методика від 08-01-2015

Версія 07



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні збігатися.

## ВСТУП

### Призначення використання (за межами США)

Даний набір виявляє продукти розпаду С-кінцевих телопептидів типу II колагену. Він призначений для діагностики *in Vitro* як індикатор деградації хряща і може бути використаний як допоміжний засіб для:

- Кількісної оцінки активності захворювання (структурного ушкодження суглобового хряща) у пацієнтів з РА і ОА
- Прогнозу активності захворювання у пацієнтів з РА і ОА, і
- Ранньої оцінки довгострокового ефекту терапії у пацієнтів з РА

### КОРОТКЕ ПОЯСНЕННЯ ДО ТЕСТУ

Порушення структурної цілісності хряща є основною гістологічною знахідкою при остеоартриті та ревматоїдному артриті. Колаген II типу є основним компонентом хряща і фрагменти колагену II типу (СТХ-II) потрапляють в кровотік, а потім виводяться із сечею в процесі деградації хряща. Рівень фрагментів СТХ-II в сечі може бути вимірний з використанням даного методу Urine CartiLaps® EIA. Показано, що метод Urine CartiLaps® EIA може бути успішно використаний в цілях прогнозу прогресії остеоартриту (Reijman (2003), Garnero (2003)), та інших клінічних та доклінічних дослідженнях (див. Список літератури).

### ПРИНЦИП МЕТОДУ

Тест-система CartiLaps® EIA (Christgau (2001) заснована на конкурентному зв'язуванні моноклональних антитіл до сечових фрагментів колагену II типу, або з біотинильованими синтетичними пептидами, зв'язаними з лунками мікропланшетів, покритими стрептавідином. Спочатку біотинильовані синтетичні пептиди зв'язуються в лунках мікропланшетів, покритих стрептавідином. Після промивання в лунки вносять стандарти, контролю і зразки сечі, а потім розчин моноклональних антитіл. Після інкубації лунки промивають і вносять розчин кон'югату пероксидази і антитіл до мишачих імуноглобулінів (кролячих). Після інкубації і промивання в лунки вносять хромогенний субстрат. Розвиток кольорової реакції зупиняють додаванням стоп-розчину - сірчаної кислоти і вимірюють абсорбцію в лунках.

### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

У лабораторії повинні дотримуватися такі застереження:

- Не можна їсти, пити, палити, застосовувати косметику там, де знаходиться імунодіагностичний матеріал
- Не набирайте розчин в піпетку ротом
- Працюйте в рукавичках з імунодіагностичним матеріалом і ретельно мийте руки після роботи
- Покривайте робочу поверхню одноразовим фільтрувальним папером
- Завжди використовувати чисті контейнери

### Увага

Набір призначений тільки для діагностики *in vitro*.

- З усіма реагентами та лабораторним обладнанням слід звертатися як з потенційно інфікованими.

### Зберігання

Нерозкриті діагностичні набори слід зберігати при 2-8 °С. У цих умовах набори стабільні до терміну, вказаного на кожній коробці.

## МАТЕРІАЛИ

### Забір зразків

Рекомендується використовувати другу порцію ранкової сечі, проте можна використовувати будь-який зразок сечі. Зразки стабільні 24 години при 4 °С і повинні бути заморожені (< -18 °С) для більш тривалого зберігання. Зразки сечі витримують не менше 10 циклів заморожування/відтавання.

Перед використанням зразки необхідно перемішати і залишити для осадження не менше ніж на 30 хвилин.

### Матеріали, що поставляються з набором

Перед тим, як відкрити набір, будь ласка, прочитайте розділ **Застереження**. Набір містить реагенти для 96 визначень.

- **Мікропланшет, покритий стрептавідином**  
12 стріпів (2x8 лунок кожний) в пластиковій рамці, покритих стрептавідином.
- **Стандарт «0» CartiLaps**  
Один флакон (мінімум 3.0 мл) готового до вживання TRIS-буферного розчину, що містить білковий стабілізатор, детергент і консервант.
- **Стандарту 1-5 CartiLaps**  
5 флаконів, що містять мінімум по 0.4 мл готових для використання стандартів - синтетичний пептид в TRIS-буферному розчині з білковим стабілізатором, детергентом і консервантом.  
Точні концентрації дивіться у сертифікаті аналізу.
- **Контролі CartiLaps**  
2 флакони (мінімум по 0,4 мл), що містять синтетичний пептид в TRIS-буферному розчині з білковим стабілізатором, детергентом і консервантом. Діапазон значень вказаний в сертифікаті аналізу.
- **Біотинильований антиген CartiLaps**  
Один флакон (мінімум 12.0 мл) готового до використання розчину біотинильованого синтетичного пептиду в PBS-буфері з білковим стабілізатором, детергентом і консервантом.
- **Перші антитіла**  
Один флакон (мінімум 12.0 мл) готового до використання розчину моноклональних антитіл в TRIS-буфері з білковим стабілізатором, детергентом, консервантом і червоним барвником.
- **Кон'югат антитіл з пероксидазою**  
Один флакон (мінімум 12.0 мл) готового до використання розчину кон'югата пероксидази і антитіл до імуноглобулінів миші (кролячих) в TRIS-буферному розчині з білковим стабілізатором, детергентом, консервантом і блакитним барвником.
- **Розчин субстрату**  
Один флакон (містить мінімум 12 мл) готового для використання тетраметилбензидину (ТМБ) в кислому розчині.  
Зауваження: хромогенний розчин може бути злегка пофарбованим у блакитний колір.
- **Стоп розчин**  
Один флакон (містить мінімум 12 мл) готової до використання 0.18 М сірчаної кислоти.
- **Буфер для промивання**  
Один флакон (містить мінімум 20 мл) концентрованого буфера для промивки, що містить детергент і консерванти.
- **Плівка**  
Адгезивна плівка для накривання стріпів під час інкубації.

### Матеріали необхідні, але не постачаються з набором

- Ємності для приготування розчину Буфера для Промивок
- Мікропіпетки для внесення обсягу 40 мкл
- 8-ми або 12-ти канальні піпетки для внесення 100 мкл
- Дистильована вода
- Холодильник (2-8 °С)
- Мікропланшетний фотометр для вимірювання при 450 і 650 нм.

### МЕТОДИКА

Для правильного виконання аналізу важливо повністю дотримуватися інструкції. Перед використанням набору дозвольте всіма компонентами досягти кімнатної температури (18-22 °С). Визначте кількість стріпів, необхідних для аналізу. Рекомендується всі зразки аналізувати в дублях, при цьому в кожну постановку необхідно включати 16 лунок для стандартів і контролів. Використовувати стріпи помістіть в тримач. Решта невикористаних стріпів необхідно зберігати в щільно закритій упаковці з осушувачем.

#### 1. Пре-інкубація

Внесіть по 100 мкл Біотинильованого Антигену CartiLaps в кожну лунку, закрийте мікропланшет адгезивною плівкою та інкубуйте 30 ± 5 хвилин при кімнатній температурі (18-22 °С), без струшування.

2. **Промивання**  
Промийте стрипи 5 разів вручну 300 мкл **Буферу для Промивок** (розведений у співвідношенні 1 + 50 дистильованою водою). При використанні автоматичного промивного пристрою (вошера) дотримуйтесь інструкції виробника обладнання або рекомендацій, прийнятим в лабораторії. Зазвичай достатньо 5 циклів промивки. Переконайтеся в тому що лунки повністю наповнюються і осушуються при кожному циклі ручної або автоматичної промивки.
3. **Перша інкубація**  
Внесіть по 40 мкл **Стандартів CartiLaps, Контролів** або зразків сечі в відповідні лунки, потім внесіть по 100 мкл **Перших Антитіл**. Закрийте мікропланшет адгезивною плівкою і інкубуйте протягом 21±3 години у холодильнику (2-8 °C), без струшування.
4. **Промивання**  
Див. Крок 2.
5. **Друга інкубація**  
Внесіть по 100 мкл **Кон'югату Антитіла/Пероксидаза** в кожну лунку. Закрийте мікропланшет адгезивною плівкою і інкубуйте протягом 60±5 хвилин при кімнатній температурі (18-22 °C), без струшування.
6. **Промивання**  
Див. Крок 2.
7. **Інкубація з хромогенним субстратом**  
Внесіть по 100 мкл Розчину субстрату в кожну лунку, закрийте стрипи плівкою і інкубуйте 15±2 хвилини у темряві при кімнатній температурі (18-22 °C), без струшування.
8. **Зупинка кольорової реакції**  
Додайте по 100 мкл стоп-розчину в усі лунки.
9. **Вимірювання оптичної щільності**  
Вимірювання можна проводити протягом двох годин при 450 нм. Рекоменується проводити зчитування при довжині хвилі порівняння 650 нм.

#### Обмеження методу

Якщо абсорбція зразка перевищує абсорбцію **Стандарту 5**, то зразок необхідно розвести **Стандартом 0** і протестувати ще раз.

#### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає використання зразків для контролю якості в кожній серії вимірювань, щоб перевірити проведення аналізу. Контролі слід обробляти так само, як і зразки пацієнтів, а результати - тими ж статистичними методами.

#### РЕЗУЛЬТАТИ

##### Розрахунок результатів

Побудуйте калібрувальну криву, використовуючи 4-параметричну регресію, і по ній інтерполяцією визначте концентрації Сечі CartiLaps в контролях і зразках.

##### Приклад отриманих результатів:

Зразок	Концентрація сечі, мкг/л	Abs <sub>450-650nm</sub> Obs1/Obs2 (Abs.)	Середнє поглинання (Abs.)	Інтерпольована концентрація (мкг/л)
Стандарт 0	0.00	1.914/1.879	1.897	
Стандарт 1	0.73	1.069/1.046	1.058	
Стандарт 2	1.32	0.822/0.806	0.814	
Стандарт 3	2.50	0.538/0.529	0.534	
Стандарт 4	5.00	0.317/0.300	0.309	
Стандарт 5	10.06	0.186/0.171	0.179	
Контроль		0.792/0.754	0.773	1.40
Контроль		0.369/0.348	0.359	4.31
Зразок 1		0.998/0.967	0.983	0.88
Зразок 2		0.407/0.433	0.420	3.52
Зразок 3		0.238/0.227	0.233	7.23

**ЗАУВАЖЕННЯ:** Дані наведені тільки в якості ілюстрації, їх не слід використовувати для розрахунків.

#### Обчислення результатів з поправкою на Концентрацію креатиніну

Для кожного зразка крім концентрації необхідно визначити концентрацію креатиніну (ммоль/л), використовуючи рутинний ензиматичний колориметричний метод для клінічного біохімічного аналізатора і виконати коригування з використанням формули:

Скориговане значення СТХ-II (нг/ммоль) = 1000 x Urine CartiLaps (мкг/л) / Креатинін (ммоль/л)

#### Характеристики методу

Відтворюваність між лотами <7.0%

Відтворюваність від партії до партії була визначена шляхом тестування трьох зразків сечі в трьох різних партіях сечі CartiLaps® СТХ-II.

Зразок	Середнє (мкг/л)	SD (мкг/л)	CV (%)
НИЗЬКИЙ	0.47	0.033	7.0
СЕРЕДНІЙ	1.87	0.064	3.4
ВИСОКИЙ	5.44	0.136	2.5

#### Межа визначення 0.20 мкг/л

Була визначена межа визначення і склала 0.20 мкг/л; це концентрація, яка відповідає середньому значенню абсорбції 21 повтору стандарту 0 Urine CartiLaps, мінус три стандартних відхилення.

#### Відтворюваність ≤12.2%

Відтворюваність визначали в десяти постановках, в кожній з яких зразки сечі аналізували в дублях.

Зразок	Середнє (мкг/л)	Всередині серії ≤ 7.8%		Між серіями ≤ 12.2%	
		SD (мкг/л)	CV (%)	SD (мкг/л)	CV (%)
НИЗЬКИЙ	0.52	0.04	7.8	0.06	12.2
СЕРЕДНІЙ	1.84	0.08	4.6	0.20	10.8
ВИСОКИЙ	5.50	0.28	5.2	0.38	6.9

#### Розведення/Лінійність 96%

Відновлення після розведення методу Urine CartiLaps® склало 96%. 4 зразка сечі були розведені Стандартом 0, концентрація СТХ-II була визначена даним методом Urine CartiLaps® EIA, витяг розрахували після корекції на коефіцієнт розведення (DF).

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4	Загальний RC
DF	RC%	RC%	RC%	RC%	96
1x	100	100	100	100	
2x	92	104	92	98	
4x	88	105	86	93	
8x	84	104	89	108	

DF: Коефіцієнт розведення, RC: Відновлення

#### Інтерференція

При додаванні перерахованих сполук у зразки людської сечі не спостерігалось будь-якого впливу на результати аналізу даним методом:

Сеча	до 30 г/л	Ібупрофен	до 50 г/л
Креатинін	до 10 мг/л	Ацетилсаліци-	
Глюкоза	до 5 мг/л	лова Кислота	до 50 г/л
Аскорбінова кислота	до 5 мг/л	Парацетамол	до 50 г/л
Альбумін	до 50 мг/л		

#### Специфічність

Епітол, розпізнаваний даним методом, є дуже законсервативний, отже, даний метод може бути використаний для аналізу зразків сечі різних видів, включаючи приматів, велику рогату худобу, коней, свиней, кролів, щурів і мишей.

#### Очікувані значення

Кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних і патологічних значень СТХ-II. Приклади середніх геометричних значень і 95% конфіденційних інтервалів (CI) для різних популяцій наведені в таблиці нижче. Більш детальну інформацію дивіться в публікаціях.

Populations	Number of subjects	Age (years)	Mean СТХ-II (ng/mmol)	95% CI (ng/mmol)
All women	459	20-85	299	79-1137
Pre 20-30 yrs	38	20-30	464	103-2086
Pre 30-60 yrs	165	30-59	200	65-618
Post	256	46-85	363	112-1172
Pre 48-53 yrs	28	48-53	164	66-410
Post 48-53 yrs	38	48-53	318	89-1132
All male	247	22-87	278	87-895
Male 20-30 yrs	27	20-30	501	214-1171
Male 30-60 yrs	141	30-60	236	89-628
Male > 60 yrs	79	60-87	305	85-1096



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»

вул. Чорновола, 97

м. Івано-Франківськ, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 123

e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)

[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»