

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA



Instructions For Use

Product Name	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Abbreviated Product Name	Urine CTX-II EIA		

1. Intended Use

For In Vitro Diagnostic Use.

The Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA is an enzyme immunological test for the quantification of degradation products of C-terminal telopeptides of Type II collagen in human urine. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data for the indication of degradation of cartilage and may be used as an aid for:

- quantitative assessment of disease activity (structural damage of articular cartilage) in patients with RA and OA
- prognosis of disease activity in patients with RA and OA, and
- early assessment of long-term effect of therapy in patients with RA

2. Summary and Explanation

Disruption of the structural integrity of cartilage is the major histological finding in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Type II collagen is the major organic constituent of cartilage and fragments of type II collagen (CTX-II) are being released into circulation and subsequently secreted into urine following degradation of cartilage. In urine, the CTX-II fragments can be quantified by Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA.

The Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA has been reported to be useful in prediction of progression of osteoarthritis¹⁻² and in other clinical and pre-clinical investigations³⁻⁹.

3. Method Description

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA is based on the competitive binding of a monoclonal antibody to urinary fragments of type II collagen⁴ or to biotinylated, synthetic peptides bound to the surface of microtitre plates coated with streptavidin.

Initially, biotinylated, synthetic peptides are bound to the surface of streptavidin-coated wells of the microtitre plate. After washing, calibrators, controls, and urine samples are pipetted into the wells followed by addition of the monoclonal antibody. The wells are washed, and a solution of peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (rabbit) is added to the wells. Following the second washing step, the wells are incubated with a chromogenic substrate. The reaction is stopped and the absorbance is measured.

4. Warnings and Precautions

The Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA is for *in vitro* diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in these Instructions For Use (IFU). Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute), howsoever caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: This kit contains material of animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent. Appropriate precautions and good laboratory practice must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Human materials

Human material used in the preparation of this product has been tested by FDA recommended assays for the presence of antibody to Human Immunodeficiency Virus (HIV I and II), Hepatitis B surface antigen, antibody to Hepatitis C, and found negative. As no test can offer complete assurance that infectious agents are absent, the reagents should be handled according to Biosafety Level 2.

Reagents containing Sodium Azide

Some reagents in this kit contain sodium azide (NaN₃) <0.1 % (w/w) which may react with lead, copper or brass plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build up.

Classification under CLP:

EUH208

Hazard statements:

EUH208 Contains a mixture of: 5-chloro-2-methyl-2h-isothiazol-3-one [ec no 247-500-7] and 2-methyl-2h-isothiazol-3-one [ec no 220-239-6]. May produce an allergic reaction.

Precautionary statements:

N/A

5. Shelf Life And Storage Of Reagents

Store the Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA kit upon receipt at 2-8°C. Under these conditions the kit is stable up to the expiry date stated on the box.

Do not use kit components beyond the expiry date and do not mix reagents from different lots.

Indications of possible deterioration of kit reagents include:

- The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.
- A decrease in the maximum binding.
- A high non-specific binding.
- A shift in the slope of the curve from its normal position.

6. Sample Collection and Storage

- For optimal results it is recommended to use urine from second morning void. Spot urine sample may be used.
- For monitoring purpose, follow up samples should be collected under same conditions as the baseline sample.
- Prior to use, urine specimens should be shaken and sedimentation allowed for a minimum of 30 minutes.
- The urine sample can be stored at 2-8°C for a maximum of 24 hours; store the samples at -20°C or lower for longer storage.
- Specimens obviously contaminated with whole blood may interfere with assay performance. These specimens should be discarded and a new specimen collected

Note:

- Samples containing particulate matter must be centrifuged before performing the assay.
- Samples displaying microbial contamination should not be assayed with the kit.
- Before performing assays, make sure that samples, calibrators and controls are at room temperature (18 - 22 °C).
- Each laboratory should follow the guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations to establish its own specimens handling and storage stability. For guidance on appropriate practices, please refer to the CLSI GP44-A4, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests".

7. Materials

Materials Provided

MICROPLAT	Streptavidin coated microtiter plate Microwell strips (12x8 wells) pre-coated with streptavidin. Supplied in a plastic frame.
CAL0	Calibrator Ready to use buffered solution with protein stabiliser, detergent and preservative; 1 vial, 3.0 mL
CAL 1 -5	Calibrators Ready to use buffered solution containing a synthetic peptide with protein stabilisers, detergent and preservative; 1 each of 5 concentration levels, 0.4 mL per vial The exact value of each standard is printed on the QC report.
CTRL 1 - 2	Controls Ready to use buffered solution containing a synthetic peptide with protein stabilisers, detergent and preservative; 1 each of 2 concentration levels, 0.4 mL per vial The established ranges for the controls are printed on the QC report.
Ag BIOTIN	Biotinylated Antigen Biotinylated synthetic peptide prepared in a buffered solution with protein stabiliser, detergent and preservative; 1 vial, 12.0 mL
Ab	Primary Antibody Ready to use buffered solution containing monoclonal antibody with protein stabiliser, detergent, preservative and red dye; 1 vial, 12.0 mL
ENZYMCONJ	Peroxidase conjugated antibody Ready to use peroxidase conjugated anti mouse immunoglobulins (rabbit) in a buffered solution with protein stabiliser, detergent, preservative and blue dye; 1 vial, 12.0 mL.
SUBS TMB	Substrate Solution Ready to use tetramethylbenzidine (TMB) substrate in an acidic buffer; 1 vial, 12.0 mL Please note that the chromogenic substrate might appear slightly blueish.
H₂SO₄	Stopping Solution Ready to use solution of 0.18 mol/L sulphuric acid; 1 vial, 12.0 mL
WASHBUF 50x	Washing Buffer Concentrated washing buffer with detergent and preservative; 1 vial, 20.0 mL

Adhesive Plate Sealer Adhesive film for covering wells during incubation.

Documentation Instructions for Use and QC report.

Materials required — not supplied

- Containers for preparing the Washing Solution
- Precision pipetting devices to deliver 40 µL
- Distilled water
- Precision 8 or 12 channel multipipette to deliver 100 µL to 300 µL
- Vortex mixer
- Automatic microplate washer (optional)
- Photometric microplate reader and data analysis equipment

8. Preparation Of Reagents

Allow all reagents to come to room temperature (18 - 22°C) for a minimum of 60 minutes before use. Do not interchange kit components from different lots.

Wash buffer preparation

Prepare by adding 1-part Wash Concentrate **WASHBUF 50x** to 50-parts distilled water.

All other reagents are supplied ready for use.

N.B. To avoid potential microbial and / or chemical contamination, unused reagents should never be returned into the original vials.

9. Assay Procedure

Prepare reagents as described in § 8. Preparation of Reagents. Mix all reagents and samples before use (avoid formation of foam).

NOTE: To ensure consistent results between runs, between operators, and to minimise any drift effect; strictly adhere to the following procedure:

- a. Bring all reagents to room temperature (18 – 22 °C) prior to use – this will take approximately 60 minutes.
- b. Seal the plate during incubations using the plate sealers which are supplied with the assay kit.
- c. Do not stack plates during incubation in order to ensure a consistent temperature for all plates.
- d. Do not under or over-fill the assay wells during the washing steps.
- e. Add reagents in the same sequence each time to reduce time deviation between reactions

Do not pipette directly from the vial containing TMB substrate. The required volume should first be transferred to a clean container. Solution remaining in the container should be discarded following use and NOT returned to the stock vial **SUBS TMB**

Determine the number of strips needed for the assay; it is recommended to test all samples in duplicate. In addition, for each run a total of 16 wells are needed for the standards and controls. Place the appropriate number of strips in the plastic frame. Store any unused strips in the tightly closed foil bag with desiccant capsules.

1. Add 100 µL of Biotinylated Antigen **Ag BIOTIN** to each well, cover with sealing tape, and incubate for 30±5 minutes at room temperature (18-22°C) without shaking.
2. Wash all wells 5 times with wash buffer

Automatic plate wash	Set plate washer to dispense 300 µL of wash solution per well
	Fill and aspirate for 5 cycles
Manual wash	Decant the contents of the wells by inverting sharply
	Pipette 300 µL of wash solution into each well, decant and repeat 5 times
	Remove excess wash buffer by tapping firmly on absorbent tissue before proceeding
	Make sure wells are completely emptied after each manual or automatic washing cycle.
	Proceed immediately to the next step at the end of washing.
3. Pipette 40 µL of Calibrators **CAL 0 – 5**, Controls **CTRL 1 - 2** or unknown samples into appropriate wells followed by 100 µL of the Antibody Solution **Ab**.
4. Cover the immunostrips with sealing tape and incubate for 21±3 hrs. at 2-8°C without shaking.
5. Wash all wells as step 2
6. Add 100 µL of the Peroxidase-Conjugated Antibody **ENZYMCONJ** to each well.
7. Cover the immunostrips with sealing tape and incubate for 60±5 minutes at room temperature (18-22°C) without shaking.
8. Wash all wells as step 2
9. Pipette 100 µL of the Substrate Solution **SUBS TMB** into each well and incubate for 15±2 minutes at room temperature (18-22°C) in the dark. Use sealing tape.

NOTE: do not pipette directly from the vial containing TMB substrate. The required volume should first be transferred to a clean container. Solution remaining in the container should be discarded following use and NOT returned to the stock vial **SUBS TMB**
10. Pipette 100 µL of the Stopping Solution **H₂SO₄** into each well.
11. Measure the absorbance at 450 nm with 650 nm as reference within two hours.

N.B. Microplate readers measure vertically; when pipetting, do not touch the bottom of the wells

Automated Platforms

The Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA kit was designed and developed to be performed manually using the protocol described above. The protocol is not necessarily applicable to automated platforms.

If automated platforms are used it is the responsibility of the user to ensure the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on automated platforms, it is recommended to increase the number of wash cycles at each wash step.

10. Calculation of Results

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic curve fit should be used.

If the absorbance of a pre-diluted sample is above **Calibrator 5**, the sample should be diluted in **Calibrator 0** and re-analysed.

For each urine sample the Urine CTX-II EIA concentration ($\mu\text{g/L}$) and the creatinine concentration ($\text{mM} = \text{mmol/L}$) should be determined using an enzymatic colorimetric method for clinical chemistry analyser.

The following equation corrects the CTX-II concentration for variation in urine concentration:

$$\text{Corrected CTX-II Value (ng/mmol)} = [1000 \times \text{CTX-II } (\mu\text{g/L})] \div \text{Creatinine (mmol/L)}$$

11. Quality Control

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples and the results analysed with appropriate statistical methods.

The two kit controls provided in the kit are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

IDS recommend the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories¹⁸.

12. Measurement Range

Detection limit 0.20 $\mu\text{g/L}$

The detection limit was determined to 0.20 $\mu\text{g/L}$, which is the concentration corresponding to three standard deviations below the mean of 21 determinations of the absorbance of the Urine CartiLaps Standard 0.

13. Limitations of Use

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays¹⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.
- The following substances do not interfere in the Urine CartiLaps[®] (CTX-II) EIA when the concentrations presented in the following table are below the stated threshold.

Potentially Interfering Agent	Threshold Concentration
Urea	30 g/L
Creatinine	10 mg/L
Glucose	5 mg/L
Ascorbic acid	5 mg/L
Albumin	50 mg/L
Ibuprofen	50 g/L
Acetyl-salicylic acid	50 g/L
Paracetamol	50 g/L

14. Expected Values

It is advisable for each laboratory to establish its own range of healthy and pathological CTX-II values. As an example, the geometric mean values and 95% confidence interval (CI) for various populations are given below. For further information, please refer to the reference list at the end of these instructions.

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

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

15. Performance Data

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

15.1 Precision

The precision was determined using ten analytical runs, each with duplicate determinations of urine samples.

Sample	Mean Conc. (µg/L)	Intra-assay		Inter-assay	
		SD (µg/L)	CV%	SD (µg/L)	CV%
Low	0.52	0.04	7.8	0.06	12.2
Medium	1.84	0.08	4.6	0.20	10.8
High	5.50	0.28	5.2	0.38	6.9

15.2 Dilution /Linearity







The dilution recovery of the Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA was determined as 96%. Four urine samples were diluted in Urine CartiLaps Standard 0. The concentration of CTX-II was determined in the UrineCartiLaps® (CTX-II) EIA and the recovery calculated after correction with the dilution factor.

Dilution Factor	Recovery (%)				Mean
	1	2	3	4	
1 x	100	100	100	100	96
2 x	92	104	92	98	
4 x	88	105	86	93	
8 x	84	104	89	108	

15.3 Specificity

The epitope detected in the Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA is highly conserved and therefore the test can be applied to urine samples from many other species, including non-human primates, bovines, horses, pigs, rabbits, rats and mice.

16. Symbols used

	Catalogue Number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Device
	Manufacturer
	Applied in accordance with directive 98/79/EC
	Caution Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a (licensed healthcare practitioner) (Only for US)
	EU Importer

17. REFERENCES

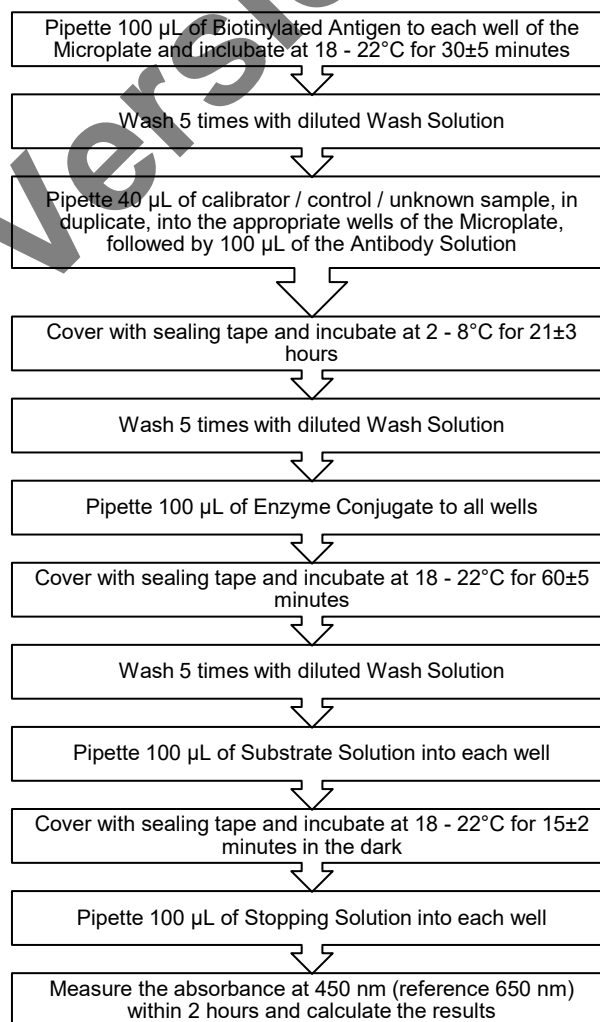
1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2004); 6: R457-68.
6. Garnero P. et al., Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
13. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
14. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
15. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
16. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
17. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.
18. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
19. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited
 10 Didcot Way, Boldon Business Park
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com
 IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany



Assay Procedure





Mode d'emploi

Nom du produit	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Nom du produit abrégé	Urine CTX-II EIA		

1. Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique *in vitro*.

L'Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA est un test immuno-enzymatique pour la quantification des produits de dégradation des télopeptides C-terminaux du collagène de Type II dans l'urine humaine. Les résultats doivent être utilisés en conjonction avec d'autres données cliniques et de laboratoire pour indiquer la dégradation du cartilage et peuvent être utilisés comme une aide pour :

- l'évaluation quantitative de l'activité de la maladie (dommages structurels du cartilage articulaire) chez les patients atteints de PR et d'arthrose
- le pronostic de l'activité de la maladie chez les patients atteints de PR et d'arthrose, et
- l'évaluation précoce de l'effet à long terme du traitement chez les patients atteints de PR

2. Résumé et explication

La perturbation de l'intégrité structurelle du cartilage est la principale constatation histologique dans l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. Le collagène de type II est le principal constituant organique du cartilage et des fragments de collagène de type II (CTX-II) sont libérés dans la circulation et ensuite sécrétés dans l'urine suite à la dégradation du cartilage. Dans l'urine, les fragments CTX-II peuvent être quantifiés par le test Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA.

Le test Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA s'est avéré utile pour prédire la progression de l'arthrose¹⁻² et dans d'autres études cliniques et précliniques³⁻⁹.

3. Description de la méthode

Le test Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA est basé sur la liaison compétitive d'un anticorps monoclonal à des fragments urinaires de collagène⁴ de type II ou à des peptides synthétiques biotinylés liés à la surface de plaques de microtitrage recouvertes de streptavidine.

Dans un premier temps, des peptides synthétiques biotinylés sont liés à la surface des puits de la plaque de microtitration recouverts de streptavidine. Après le lavage, les étalons, les contrôles et les échantillons d'urine sont pipetés dans les puits, puis l'anticorps monoclonal est ajouté. Les puits sont lavés, et une solution d'immunoglobuline anti-souris (lapin) conjuguée à la peroxydase est ajoutée aux puits. Après la deuxième étape de lavage, les puits sont incubés avec un substrat chromogène. La réaction est arrêtée et l'absorbance est mesurée.

4. Avertissements et précautions

L'Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA est uniquement destiné au diagnostic *in vitro* et n'est pas destiné à un usage interne chez les humains ou les animaux. Ce produit doit être utilisé en stricte conformité avec les instructions contenues dans ce mode d'emploi. Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) ne pourra être tenu responsable de quelque perte ou dommage que ce soit (sauf dans les cas prévus par la loi) découlant du non-respect des instructions fournies.

MISE EN GARDE : ce kit contient une substance d'origine animale. Manipuler les réactifs du kit en gardant à l'esprit qu'ils peuvent transmettre un agent infectieux. Appliquer les précautions et les bonnes pratiques de laboratoire qui s'imposent pour le stockage, la manipulation et l'élimination des réactifs du kit. L'élimination des réactifs du kit doit être effectuée dans le respect des réglementations locales.

Substances d'origine humaine

La substance humaine utilisée dans la préparation de ce produit a été soumise aux analyses recommandées par la FDA pour la détection des anticorps du virus de l'immunodéficience humaine (HIV I et II), de l'antigène de surface de l'hépatite B, des anticorps de l'hépatite C, et s'est révélée négative. Aucun test ne pouvant garantir de manière absolue l'absence d'agents infectieux, les réactifs doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2.

Réactifs contenant de l'azoture de sodium

Certains des réactifs de ce kit contiennent de l'azoture de sodium (NaN_3) < 0,1 % (m/m) qui est susceptible de réagir avec le plomb, le cuivre ou le laiton des canalisations pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grands volumes d'eau afin d'éviter toute accumulation d'azoture.

Classification selon le règlement CLP :
EUH208

Mentions de danger :

EUH208 Contient un mélange de :
5-chloro-2-méthyl-2h-isothiazol-3-one
[ec no 247-500-7] et 2-méthyl-2h-isothiazol-3-one
[ec no 220-239-6]. Risque de réaction allergique.

Mentions de précaution :

S/O

5. Durée de conservation et stockage des réactifs

Conservez le kit Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA dès réception entre 2 et 8 °C. Dans ces conditions, le kit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte.

Ne pas utiliser les éléments du kit après leur date de péremption et ne pas mélanger les réactifs provenant de différents lots de kits.

Les indications de détérioration possible des réactifs du kit sont notamment :

- la présence de particules anormales dans l'un des réactifs.
- une diminution de la contrainte maximale.
- un haut niveau de liaison non spécifique.
- un décalage de la pente de la courbe par rapport à sa position normale.

6. Prélèvement et conservation des échantillons

- Pour des résultats optimaux, il est recommandé d'utiliser l'urine de la deuxième miction du matin. Un échantillon d'urine ponctuel peut être utilisé.
- À des fins de surveillance, les échantillons de suivi doivent être prélevés dans les mêmes conditions que l'échantillon de référence.
- Avant l'utilisation, les échantillons d'urine doivent être agités et sédimentés pendant au moins 30 minutes.
- L'échantillon d'urine peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 24 heures ; conservez les échantillons à -20 °C ou moins pour une conservation plus longue.
- Les échantillons manifestement contaminés par du sang total peuvent interférer avec les performances du test. Ces échantillons doivent être jetés et un nouvel échantillon doit être collecté

Remarque :

- Les échantillons contenant des particules doivent être centrifugés avant l'analyse.
- Les échantillons présentant une contamination microbienne ne doivent pas être analysés avec le kit.
- Avant d'effectuer des tests, assurez-vous que les échantillons, les étalons et les contrôles sont à température ambiante (18–22 °C).
- Il incombe à chaque laboratoire de respecter les consignes ou réglementations locales et/ou nationales ou celles des organismes agréés en la matière afin de définir ses propres normes de manipulation des échantillons et de stabilité lors du stockage. Pour des orientations sur les pratiques appropriées, se reporter au document CLSI GP44-A4, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests".

7. Matériel

Matériel fourni

MICROPLAT

Plaque de microtitration recouverte de streptavidine

Bandes de micropuits (12x8 puits) pré-enduites de streptavidine. Fournies dans un cadre en plastique.

CAL0

Étalon

Solution tamponnée prête à l'emploi avec stabilisateur de protéines, détergent et conservateur ; 1 flacon, 3,0 mL

CAL 1 – 5

Étalons

Solution tamponnée prête à l'emploi contenant un peptide synthétique avec des stabilisateurs de protéines, un détergent et un conservateur ; 1 de chacun des 5 niveaux de concentration, 0,4 mL par flacon
La valeur exacte de chaque étalon figure dans le rapport de contrôle qualité (CQ).

CTRL 1 – 2

Contrôles

Solution tamponnée prête à l'emploi contenant un peptide synthétique avec des stabilisateurs de protéines, un détergent et un conservateur ; 1 de chacun des 2 niveaux de concentration, 0,4 mL par flacon
Les plages établies pour les contrôles figurent dans le rapport de CQ.

Ag BIOTIN

Antigène biotinylé

Peptide synthétique biotinylé préparé dans une solution tamponnée avec un stabilisateur de protéines, un détergent et un conservateur ; 1 flacon, 12,0 mL

Ab

Anticorps primaire

Solution tamponnée prête à l'emploi contenant un anticorps monoclonal avec un stabilisateur de protéines, un détergent, un conservateur et un colorant rouge ; 1 flacon, 12,0 mL

ENZYMCONJ

Anticorps conjugué à la peroxydase

Immunoglobulines anti-souris (lapin) conjuguées à la peroxydase, prêtes à l'emploi, dans une solution tamponnée avec un stabilisateur de protéines, un détergent, un conservateur et un colorant bleu ; 1 flacon, 12,0 mL.

SUBS TMB

Solution de substrat

Substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) prêt à l'emploi dans un tampon acide ; 1 flacon, 12,0 mL.
Veuillez noter que le substrat chromogène peut apparaître légèrement bleuâtre.

H₂SO₄

Solution d'arrêt

Solution prête à l'emploi de 0,18 mol/L d'acide sulfurique ; 1 flacon, 12,0 mL

WASHBUF 50x

Tampon de lavage

Tampon de lavage concentré avec détergent et conservateur ; 1 flacon, 20,0 mL

Ruban d'étanchéité pour plaque Film adhésif pour recouvrir les puits pendant l'incubation.
Documentation Mode d'emploi et rapport de CQ.

Matériel requis — non fourni

- Récipients pour la préparation de la solution de lavage
- Dispositifs de pipetage de précision permettant de distribuer 40 µL
- Eau distillée
- Multipipette de précision à 8 ou 12 canaux permettant de distribuer de 100 µL à 300 µL
- Agitateur vortex
- Laveur automatique de microplaques (en option)
- Lecteur photométrique de microplaques et équipement d'analyse de données

8. Préparation des réactifs

Laissez tous les réactifs revenir à température ambiante (18 à 22 °C) pendant au moins 60 minutes avant utilisation. Ne pas mélanger les composants de kits provenant de lots différents.

Préparation du tampon de lavage

Préparez en ajoutant 1 volume de concentré de lavage **WASHBUF 50x** à 50 volumes d'eau distillée.

Tous les autres réactifs sont fournis prêts à l'emploi.

N.B. Pour éviter toute contamination microbienne et/ou chimique potentielle, les réactifs non utilisés ne doivent jamais être remis dans les flacons d'origine.

9. Procédure d'analyse

Préparez les réactifs comme indiqué dans le paragraphe 8. Préparation des réactifs. Mélangez tous les réactifs et les échantillons avant utilisation (évitez la formation de mousse).

REMARQUE : Afin de garantir des résultats cohérents entre les analyses, entre les opérateurs et afin de limiter les écarts, suivez scrupuleusement la procédure suivante :

- a. Laissez tous les réactifs revenir à température ambiante (18–22 °C) avant utilisation — cela prend environ 60 minutes.
- b. Couvrez la plaque pendant les incubations avec le film de scellage fourni dans le kit de dosage.
- c. N'empilez pas les plaques pendant l'incubation afin de garantir une température homogène pour chacune d'elles.
- d. Ne remplissez ni trop ni trop peu les cupules pendant les étapes de lavage.
- e. Ajoutez les réactifs dans la même séquence à chaque fois pour réduire l'écart de temps entre les réactions

Ne pipetez pas directement dans le flacon contenant le substrat TMB. Le volume requis doit d'abord être transféré dans un conteneur propre. La solution restant dans le récipient doit être jetée après utilisation et NE doit PAS être remise dans le flacon de stockage **SUBS TMB**

Déterminez le nombre de bandelettes nécessaires pour l'analyse ; il est recommandé de tester tous les échantillons en double. En outre, pour chaque cycle, 16 puits au total sont nécessaires pour les normes et les contrôles. Placez le nombre approprié de bandelettes dans le cadre en plastique. Conservez les bandelettes non utilisées dans le sachet en aluminium hermétiquement fermé contenant les capsules déshydratantes.

1. Ajouter 100 µL d'Antigène biotinylé **Ag BIOTIN** dans chaque puits, couvrir avec du ruban d'étanchéité et incubé pendant 30±5 minutes à température ambiante (18 à 22 °C) sans agitation.
2. Laver tous les puits 5 fois avec le tampon de lavage

Lavage automatique des plaques	Régler le laveur de plaques pour qu'il distribue 300 µL de solution de lavage par puits Remplir et aspirer sur 5 cycles Transvaser le contenu des puits en les retournant rapidement Pipeter 300 µL de la solution de lavage dans chaque puits, transvaser et répéter 5 fois Enlever l'excès de tampon de lavage en appliquant bien la plaque sur un papier absorbant avant de continuer
Lavage manuel	

Assurez-vous que les puits sont complètement vidés après chaque cycle de lavage manuel ou automatique.
 Passez immédiatement à l'étape suivante à la fin du lavage.
3. Pipeter 40 µL d'étalons **CAL 0 – 5**, de contrôles **CTRL 1 - 2** ou d'échantillons inconnus dans les puits appropriés, puis 100 µL de la solution d'anticorps **Ab**.
4. Couvrir les immunobandes avec du ruban d'étanchéité et incubé pendant 21 ±3 heures à 2–8 °C sans agiter.
5. Laver tous les puits comme à l'étape 2
6. Ajouter 100 µL d'anticorps conjugué à la peroxydase **ENZYMCONJ** à chaque puits.
7. Couvrir les immunobandes avec du ruban d'étanchéité et les incubé pendant 60 ±5 minutes à température ambiante (18 à 22 °C) sans les agiter.
8. Laver tous les puits comme à l'étape 2
9. Pipeter 100 µL de la solution de substrat **SUBS TMB** dans chaque puits et incubé pendant 15 ±2 minutes à température ambiante (18 à 22 °C) dans l'obscurité. Utiliser un ruban d'étanchéité.
REMARQUE : ne pipetez pas directement dans le flacon contenant le substrat TMB. Le volume requis doit d'abord être transféré dans un conteneur propre. La solution restant dans le récipient doit être jetée après utilisation et NE doit PAS être remise dans le flacon de stockage **SUBS TMB**
10. Pipeter 100 µL de la solution d'arrêt **H₂SO₄** dans chaque puits.
11. Mesurer l'absorbance à 450 nm avec 650 nm comme référence dans les deux heures.

N.B. Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement ; lors du pipetage, ne touchez pas le fond des puits

Plateformes automatisées

Le kit Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA a été conçu et développé pour être réalisé manuellement selon le protocole décrit ci-dessus. Le protocole n'est pas nécessairement applicable aux plateformes automatisées.

Si des plateformes automatisées sont utilisées, il incombe à l'utilisateur de s'assurer que le kit a été testé de manière appropriée. Pour améliorer les performances du kit sur les plateformes automatisées, il est recommandé d'augmenter le nombre de cycles de lavage à chaque étape de lavage.

10. Calcul des résultats

Il existe divers logiciels de réduction des données, ils permettent de générer la courbe d'étalonnage moyenne et de calculer les concentrations moyennes d'échantillons et de contrôles inconnus. Un ajustement de la courbe logistique à 4 paramètres doit être utilisé.

Si l'absorbance d'un échantillon pré-dilué est supérieure à l'**étalon 5**, l'échantillon doit être dilué dans un **étalon 0** et être ré-analysé.

Pour chaque échantillon d'urine, la concentration de Urine CTX-II EIA CrossLaps (µg/L) et la concentration de créatinine (mM= mmol/L) doivent être déterminées en utilisant une méthode colométrique enzymatique pour analyseur de chimie clinique.

L'équation suivante corrige la concentration de CTX-II en fonction de la variation de la concentration urinaire :
valeur corrigée du CTX-II (ng/mmol) = [1 000 x CTX-II (µg/L)] ÷ Créatinine (mmol/L)

11. Contrôle qualité

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent l'utilisation d'échantillons de contrôle qualité dans chaque série de dosages afin de vérifier la performance du dosage. Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus et les résultats doivent être analysés à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

Les deux contrôles fournis dans le kit sont destinés à aider à évaluer la validité des résultats obtenus avec chaque plaque de test.

IDS recommande aux utilisateurs de conserver les enregistrements graphiques des valeurs de contrôle générés après chaque analyse, y compris les moyennes mobiles, les écarts-types et les coefficients de variation. Ces informations faciliteront l'analyse des tendances des contrôles comparé aux performances des lots de contrôle précédents et actuels par rapport aux données de contrôle qualité fournies. La tendance favorise l'identification des analyses qui donnent des valeurs de contrôle nettement différentes de la plage moyenne.

Lors de l'interprétation des données de contrôle, les utilisateurs doivent noter que ce produit a été conçu et développé comme un produit manuel. La plage définie sur le certificat de CQ doit être adaptée aux analyses effectuées manuellement et dans le strict respect de la Procédure d'analyse décrite précédemment. Tous les professionnels du contrôle qualité s'accordent à dire que, compte tenu des différences en termes de conditions et de pratiques, il y aura toujours un écart dans les valeurs moyennes et la précision des mesures de contrôle entre des laboratoires différents¹⁸.

12. Plage de mesures

Limite de détection 0,20 µg/L

La limite de détection a été déterminée à 0,20 µg/L, soit la concentration correspondant à trois écarts types en dessous de la moyenne de 21 déterminations de l'absorbance de l'étalon 0 de Urine CartiLaps.

13. Limites d'utilisation

- Comme pour toute procédure diagnostique, les résultats doivent être interprétés eu égard au tableau clinique du patient et aux autres informations à la disposition du médecin.
- Les caractéristiques de performance de cette analyse n'ont pas été démontrées en pédiatrie.
- Des anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines du réactif et interférer avec les immunodosages *in vitro*¹⁹. Les patients quotidiennement exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent être sujets à ce type d'interférence, il convient alors d'examiner toute valeur anormale.
- Les substances suivantes n'influent pas sur l'Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA lorsque les concentrations présentées dans le tableau suivant se situent en-dessous du seuil indiqué.

Agent pouvant interférer	Seuil de concentration
Urée	30 g/L
Créatinine	10 mg/L
Glucose	5 mg/L
Acide ascorbique	5 mg/L
Albumine	50 mg/L
Ibuprofène	50 g/L
Acide acétylsalicylique	50 g/L
Paracétamol	50 g/L

14. Valeurs attendues

Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir sa propre fourchette de valeurs saines et pathologiques du CTX-II. A titre d'exemple, les valeurs de la moyenne géométrique et l'intervalle de confiance (IC) à 95 % pour diverses populations sont donnés ci-dessous. Pour plus d'informations, veuillez vous référer à la liste de référence à la fin de ces instructions.

Population	Nombre de sujets	Âge (ans)	CTX-II moyen (ng/mmol)	IC à 95 % (ng/mmol)
Toutes les femmes	459	20–85	299	79–1 137
Préménopause	38	20–30	464	103–2 086
	165	30 - 59	200	65–618
	28	48–53	164	66–410
Post-ménopause	38	48–53	318	89–1 132
	256	46–85	363	112–1 172
Tous les hommes	247	22–87	278	87–895
Homme	27	20–30	501	214–1 171
	141	30–60	236	89–628
	79	> 60	305	85–1 096

Les plages ci-dessus doivent être considérées uniquement comme des directives, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres plages attendues sur la base de sa population de patients.

15. Données de performances

Les données de performances représentatives s'affichent. Les résultats obtenus dans chaque laboratoire peuvent varier.

15.1 Précision

La précision a été déterminée en utilisant dix séries d'analyses, chacune avec des déterminations en double d'échantillons d'urine.

Échantillon	Conc. moyenne (µg/L)	Intra-analyse		Inter-analyses	
		ET (µg/L)	CV%	ET (µg/L)	CV%
Faible	0,52	0,04	7,8	0,06	12,2
Moyen	1,84	0,08	4,6	0,20	10,8
Haut	5,50	0,28	5,2	0,38	6,9

15.2 Dilution/linéarité

La récupération après dilution de l'Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA a été déterminée à 96 %. Quatre échantillons d'urine ont été dilués dans de l'urine CartiLaps Standard 0. La concentration de CTX-II a été déterminée dans l'UrineCartiLaps® (CTX-II) EIA et la récupération calculée après correction avec le facteur de dilution.

Facteur de dilution	Récupération (%)				Moyenne
	1	2	3	4	
1 fois	100	100	100	100	96
2 fois	92	104	92	98	
4 fois	88	105	86	93	
8 fois	84	104	89	108	

15.3 Spécificité

L'épitope détecté dans l'Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA est hautement conservé et le test peut donc être appliqué à des échantillons d'urine provenant de nombreuses autres espèces, notamment les primates non humains, les bovins, les chevaux, les porcs, les lapins, les rats et les souris.

16. Symboles utilisés



Numéro de référence



Dispositif de diagnostic *in vitro*



Fabricant



Appliqué conformément à la directive 98/79/CE

Rx Only

Attention : d'après la loi fédérale américaine, ce dispositif ne peut être vendu que par un (professionnel de la santé) ou sur son ordonnance. (États-Unis uniquement)



[Importateur UE](#)

17. RÉFÉRENCES

1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2004); 6: R457-68.
6. Garnero P. et al., Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
13. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
14. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
15. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
16. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
17. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.
18. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
19. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited
 10 Didcot Way, Boldon Business Park
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com
 IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany



Procédure d'analyse

Pipetez 100 µL d'antigène biotinylé dans chaque puits de la microplaque et incubez à 18–22 °C pendant 30 ±5 minutes

Lavez 5 fois avec la solution de lavage

Pipetez 40 µL d'étalon/de contrôle/d'échantillon inconnu, en double, dans les puits appropriés de la microplaque, puis 100 µL de la solution d'anticorps

Couvrez avec du ruban d'étanchéité et incubez à 2–8 °C pendant 21 ±3 heures

Lavez 5 fois avec la solution de lavage

Pipetez 100 µL de conjugué enzymatique dans tous les puits

Couvrez avec du ruban d'étanchéité et incubez à 18–22 °C pendant 60 ±5 minutes

Lavez 5 fois avec la solution de lavage

Pipetez 100 µL de solution de substrat dans chaque puits

Couvrir avec du ruban d'étanchéité et incubez à 18–22 °C pendant 15 ±2 minutes dans l'obscurité

Pipetez 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits

Mesurez l'absorbance à 450 nm (référence 650 nm) dans les 2 heures et calculez les résultats



Produktname	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Abgekürzter Produktname	Urine CTX-II EIA		

1. Verwendungszweck

Für die diagnostische *In-vitro*-Verwendung.

Der Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA ist ein enzymimmunologischer Test zur Quantifizierung der Abbauprodukte der C-terminalen Telopeptide des Typ-II-Kollagens in menschlichem Urin. Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Labordaten als Hinweis auf Knorpelabbau verwendet werden und dienen als Hilfsmittel für Folgendes:

- quantitative Bewertung der Krankheitsaktivität (strukturelle Schädigung des Gelenkknorpels) bei Patienten mit RA und OA,
- Prognose der Krankheitsaktivität bei Patienten mit RA und OA und
- frühzeitige Beurteilung der Langzeitwirkung einer Therapie bei Patienten mit RA.

2. Zusammenfassung und Beschreibung

Die Störung der strukturellen Integrität des Knorpels stellt den wichtigsten histologischen Befund bei Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis dar. Typ-II-Kollagen ist der organische Hauptbestandteil von Knorpel. Fragmente des Typ-II-Kollagens (CTX-II) werden nach dem Abbau des Knorpels in den Blutkreislauf freigesetzt und anschließend mit dem Urin ausgeschieden. Im Urin können die CTX-II-Fragmente mittels Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA quantifiziert werden.

Der Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA hat sich bei der Vorhersage des Voranschreitens von Osteoarthritis¹⁻² und in anderen klinischen und präklinischen Untersuchungen³⁻⁹ als nützlich erwiesen.

3. Methodenbeschreibung

Der Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA basiert auf der kompetitiven Bindung eines monoklonalen Antikörpers an Urinfragmente des Typ-II-Kollagens⁴ oder an biotinylierte, synthetische Peptide, die an die Oberfläche von mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten gebunden sind.

Zunächst werden biotinylierte, synthetische Peptide an die Oberfläche von mit Streptavidin beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte gebunden. Nach dem Waschen werden die Kalibratoren, Kontrollen und Urinproben in die Vertiefungen pipettiert, gefolgt von der Zugabe des monoklonalen Antikörpers. Die Vertiefungen werden gewaschen und eine Lösung von Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-Immunglobulin (Kaninchen) wird in die Vertiefungen gegeben. Nach dem zweiten Waschschrift werden die Vertiefungen mit einem chromogenen Substrat inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt und die Absorption wird gemessen.

4. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Der Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA dient ausschließlich der *In-vitro*-Diagnose und nicht zur internen Anwendung bei Menschen oder Tieren. Das Produkt muss streng gemäß der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Anleitungen verwendet werden. Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) ist nicht haftbar für Verluste oder Schäden aufgrund der Nichtbeachtung dieser Anweisungen (außer in Fällen, in denen dies durch Gesetze vorgeschrieben ist), unabhängig davon, wie diese entstanden sind.

ACHTUNG: Dieses Kit enthält Material tierischen Ursprungs. Behandeln Sie Kit-Reagenzien so, als ob diese Infektionserreger übertragen könnten. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Kit-Reagenzien müssen geeignete Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken Anwendung finden. Die Entsorgung der Kit-Reagenzien nach den örtlichen Vorschriften durchführen.

Humanmaterial

Humanmaterial, das für die Vorbereitung dieses Produkts verwendet wurde, wurde anhand von FDA-empfohlenen Assays auf das Vorhandensein von Antikörpern für den humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), das Hepatitis B-Oberflächenantigen sowie Antikörper für Hepatitis C geprüft und als negativ befunden. Da bei keinem Test vollständig ausgeschlossen werden kann, dass infektiöse Stoffe vorhanden sind, müssen die Reagenzien gemäß der biologischen Schutzstufe 2 gehandhabt werden.

Natriumazid enthaltende Reagenzien

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid (NaN_3) < 0,1 % (w/w), welches mit Blei-, Kupfer- oder Messingleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden kann. Verwenden Sie bei der Entsorgung große Mengen an Wasser, um die Bildung von Aziden zu verhindern.

Einstufung gemäß CLP:
EUH208

Gefahrenhinweise:

EUH208 Enthält eine Mischung aus:
5-Chlor-2-methyl-2h-isothiazol-3-on
[ec Nr. 247-500-7] und
2-methyl-2h-isothiazol-3-on [ec Nr. 220-239-6].
Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Sicherheitshinweise:

n. z.

5. Haltbarkeit und Lagerung von Reagenzien

Lagern Sie das Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-Kit nach Erhalt bei 2–8 °C. Unter diesen Bedingungen ist das Kit bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum stabil.

Verwenden Sie keine Bestandteile des Kits, deren Verfallsdaten abgelaufen sind, und mischen Sie keine Reagenzien verschiedener Chargen miteinander.

Anzeichen für eine mögliche Schädigung der Kit-Reagenzien sind u. a.:

- wenn abnormer Feinstaub in einem Reagenz vorhanden ist
- eine Abnahme der maximalen Bindung
- eine hohe unspezifische Bindung
- wenn die Steigung der Kurve von ihrer normalen Position abweicht

6. Probenentnahme und -lagerung

- Für optimale Ergebnisse wird empfohlen, den Urin der zweiten morgendlichen Entleerung zu verwenden. Es kann eine Urin-Stichprobe verwendet werden.
- Für die Überwachung wird empfohlen, dass Folgeproben unter den gleichen Bedingungen wie die Ausgangsprobe entnommen werden sollten.
- Vor der Verwendung sollten die Urinproben geschüttelt und mindestens 30 Minuten lang sedimentiert werden.
- Die Urinprobe kann bei 2–8 °C für maximal 24 Stunden gelagert werden. Für längerfristige Lagerung bei –20 °C oder niedriger aufbewahren.
- Offensichtlich mit Vollblut kontaminierte Proben können die Leistung des Assays beeinträchtigen. In diesem Fall sollte die Probe verworfen und eine neue Probe entnommen werden.

Hinweis:

- Proben, welche Partikelmasse enthalten, müssen vor dem Durchführen des Assays zentrifugiert werden.
- Proben, die eine mikrobielle Kontamination aufweisen, sollten nicht mit dem Kit untersucht werden.
- Stellen Sie vor dem Durchführen von Assays sicher, dass die Proben, Kalibratoren und Kontrollen Raumtemperatur (18–22 °C) angenommen haben.
- Jedes Labor hat bei der Sicherstellung seiner eigenen Probenhandhabungs- und Lagerstabilität die Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher und/oder bundesstaatlicher Regulierungs- oder Akkreditierungsbehörden zu beachten. Lesen Sie für Informationen zu geeigneten Vorgehensweisen die Richtlinien CLSI GP44-A4, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests".

7. Materialien

Bereitgestellte Materialien

MICROPLAT

Mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte

Mikrotiterstreifen (12 x 8 Vertiefungen), mit Streptavidin vorbeschichtet. Geliefert in einem Kunststoffrahmen.

CAL0

Kalibrator

Gebrauchsfertige gepufferte Lösung mit Proteinstabilisator, Tensid und Konservierungsmittel; 1 Fläschchen, 3,0 mL

CAL 1–5

Kalibratoren

Gebrauchsfertige gepufferte Lösung, die ein synthetisches Peptid mit Proteinstabilisatoren, Tensid und Konservierungsmittel enthält; je 1 von 5 Konzentrationsstufen, 0,4 mL pro Fläschchen
Der genaue Wert jedes Standards wird auf dem QK-Bericht ausgedruckt.

CTRL 1–2

Kontrollen

Gebrauchsfertige gepufferte Lösung, die ein synthetisches Peptid mit Proteinstabilisatoren, Tensid und Konservierungsmittel enthält; je 1 von 2 Konzentrationsstufen, 0,4 mL pro Fläschchen
Die festgelegten Bereiche für die Kontrollen werden auf dem QK-Bericht ausgedruckt.

Ag BIOTIN

Biotinyliertes Antigen

Biotinyliertes synthetisches Peptid, hergestellt in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisator, Tensid und Konservierungsmittel; 1 Fläschchen, 12,0 mL

Ab

Primärer Antikörper

Gebrauchsfertige gepufferte Lösung, die monoklonale Antikörper mit Proteinstabilisator, Tensid, Konservierungsmittel und rotem Farbstoff enthält; 1 Fläschchen, 12,0 mL

ENZYMCONJ

Peroxidase-konjugierter Antikörper

Gebrauchsfertige Peroxidase-konjugierte Anti-Maus-Immunglobuline (Kaninchen) in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisator, Tensid, Konservierungsmittel und blauem Farbstoff; 1 Fläschchen, 12,0 mL.

SUBS TMB

Substratlösung

Gebrauchsfertiges Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat in einem sauren Puffer; 1 Fläschchen, 12,0 mL
Bitte beachten Sie, dass das chromogene Substrat leicht bläulich erscheinen kann.

H₂SO₄

Stopplösung

Gebrauchsfertige Lösung von 0,18 mol/L Schwefelsäure; 1 Fläschchen, 12,0 mL

WASHBUF 50x

Waschpuffer

Konzentrierter Waschpuffer mit Tensid und Konservierungsmittel; 1 Fläschchen, 20,0 mL

Selbstklebende Plattenversiegelung Klebefolie zum Abdecken von Vertiefungen während der Inkubation.

Dokumentation Gebrauchsanweisung und QK-Bericht.

Erforderliche Materialien – nicht mitgeliefert

- Behälter zur Herstellung der Waschlösung
- Präzisionspipettiergeräte zur Entnahme von 40 µL
- Destilliertes Wasser
- Präzisionsmultipipette mit 8 oder 12 Kanälen für 100 µL bis 300 µL
- Vortexmischer
- Automatisches Mikroplatten-Waschgerät (optional)
- Photometrisches Mikroplattenlesegerät und Ausrüstung zur Datenanalyse

8. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien vor dem Gebrauch mindestens 60 Minuten lang auf Raumtemperatur (18–22 °C) bringen. Keine Kit-Komponenten aus verschiedenen Chargen austauschen.

Vorbereitung des Waschpuffers

Durch Zugabe von einem Teil Waschkonzentrat **WASHBUF 50x** auf 50 Teile destilliertes Wasser vorbereiten.

Alle anderen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

ACHTUNG Um eine mögliche mikrobielle und/oder chemische Kontamination zu vermeiden, sollten unbenutzte Reagenzien niemals in die Originalgefäße zurückgegeben werden.

9. Assay-Verfahren

Die Reagenzien so vorbereiten wie in § 8 „Vorbereitung der Reagenzien“ beschrieben. Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch mischen (Schaumbildung vermeiden).

HINWEIS: Um zwischen einzelnen Testläufen und verschiedenen Bedienern konsistente Ergebnisse sicherzustellen und um einen Abweichungseffekt zu minimieren, sind die folgenden Maßnahmen strengstens einzuhalten:

- a. Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–22 °C) bringen – dies dauert etwa 60 Minuten.
- b. Die Platten während der Inkubationen mit den Plattenversiegelungen versiegeln, die im Lieferumfang des Assay-Kits enthalten sind.
- c. Platten während der Inkubation nicht übereinander stapeln, um eine gleichbleibende Temperatur für alle Platten sicherzustellen.
- d. Während der Waschschriffe nicht zu viel und nicht zu wenig Flüssigkeit in die Platten-Vertiefungen füllen.
- e. Fügen Sie Reagenzien jedes Mal in der gleichen Reihenfolge hinzu, um die Zeitabweichung zwischen den Reaktionen zu verringern

Nicht direkt aus dem Fläschchen mit TMB-Substrat pipettieren. Das erforderliche Volumen sollte zunächst in einen sauberen Behälter umgefüllt werden. Die im Behälter verbliebene Lösung sollte nach Gebrauch entsorgt und NICHT in das Lagerfläschchen **SUBS TMB** zurückgegeben werden

Bestimmen Sie die Anzahl der für den Assay benötigten Streifen; es wird empfohlen, alle Proben in zweifacher Ausführung zu testen. Darüber hinaus werden für jeden Lauf insgesamt 16 Vertiefungen für die Standards und Kontrollen benötigt. Legen Sie die entsprechende Anzahl von Streifen in den Kunststoffrahmen. Bewahren Sie unbenutzte Streifen in dem fest verschlossenen Folienbeutel mit Trockenmittelkapseln auf.

1. 100 µL biotinyliertes Antigen **Ag BIOTIN** in jede Vertiefung geben, mit Dichtungsband abdecken und 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (18–22 °C) ohne Schütteln inkubieren.
2. Alle Vertiefungen 5 Mal mit Waschpuffer waschen.

<p>Automatisches Waschen der Platte</p> <p>Manuelles Waschen</p>	<p>Plattenwaschgerät so einstellen, dass mindestens 300 µL Waschlösung pro Vertiefung abgegeben werden</p> <p>5 Füll- und Aspirier-Zyklen programmieren</p> <p>Den Inhalt der Vertiefungen durch ruckartiges Umdrehen ausgießen</p> <p>300 µL der Waschlösung in jede Vertiefung pipettieren, dekantieren und 5 Mal wiederholen</p> <p>Entfernen Sie überschüssigen Waschpuffer durch festes Klopfen auf das absorbierende Gewebe, bevor Sie fortfahren</p> <p>Stellen Sie sicher, dass die Vertiefungen nach jedem manuellen oder automatischen Waschzyklus vollständig entleert werden.</p> <p>Fahren Sie am Ende des Waschvorgangs sofort mit dem nächsten Schritt fort.</p>
--	---
3. 40 µL der Kalibratoren **CAL 0–5**, der Kontrollen **CTRL 1–2** oder der unbekanntenen Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren, gefolgt von 100 µL der Antikörperlösung **Ab**.
4. Die Immunostrips mit Dichtungsband abdecken und 21 ± 3 Std. bei 2–8 °C ohne Schütteln inkubieren.
5. Alle Vertiefungen wie in Schritt 2 waschen.
6. 100 µL des Peroxidase-konjugierten Antikörpers **ENZYMCONJ** in jede Vertiefung geben.
7. Die Immunostreifen mit Dichtungsband abdecken und für 60 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (18–22 °C) ohne Schütteln inkubieren.
8. Alle Vertiefungen wie in Schritt 2 waschen.
9. 100 µL der Substratlösung **SUBS TMB** in jede Vertiefung pipettieren und für 15 ± 2 Minuten bei Raumtemperatur (18–22 °C) im Dunkeln inkubieren. Dichtungsband verwenden.

HINWEIS: Nicht direkt aus dem Fläschchen mit TMB-Substrat pipettieren. Das erforderliche Volumen sollte zunächst in einen sauberen Behälter umgefüllt werden. Die im Behälter verbliebene Lösung sollte nach Gebrauch entsorgt und NICHT in das Lagerfläschchen **SUBS TMB** zurückgegeben werden
10. 100 µL der Stopplösung **H₂SO₄** in jede Vertiefung pipettieren.
11. Die Absorption bei 450 nm mit 650 nm als Referenz innerhalb von zwei Stunden messen.

ACHTUNG Mikroplattenlesegeräte messen vertikal; beim Pipettieren nicht den Boden der Vertiefungen berühren

Automatisierte Plattformen

Das Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-Kit wurde so konzipiert und entwickelt, dass es manuell mit dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt werden kann. Das Protokoll ist nicht zwangsläufig für automatisierte Plattformen anwendbar.

Wenn automatisierte Plattformen verwendet werden, muss der Benutzer sicherstellen, dass das Kit angemessen getestet wurde. Um die Leistung des Kits in automatisierten Plattformen zu verbessern, wird empfohlen, die Anzahl der Waschzyklen bei jedem Waschschritt zu erhöhen.

10. Berechnung der Ergebnisse

Es gibt eine Vielzahl von Softwarepaketen für die Datenreduktion. Mit einer solchen Software können die Mittelwerte der Kalibrierungskurve generiert und die durchschnittlichen Konzentrationen unbekannter Proben und Kontrollen berechnet werden. Es sollte eine logistische 4-Parameter-Kurve verwendet werden.

Wenn die Absorption einer vorverdünnten Probe über **Kalibrator 5** liegt, sollte die Probe in **Kalibrator 0** verdünnt und erneut analysiert werden.

Für jede Urinprobe sollten die Urine CTX-II EIA CrossLaps-Konzentration ($\mu\text{g/L}$) und die Kreatinin-Konzentration ($\text{mM} = \text{mmol/L}$) mit einer enzymatischen kolometrischen Methode für klinisch-chemische Analysegeräte bestimmt werden.

Die folgende Gleichung korrigiert die CTX-II-Konzentration um Schwankungen der Urinkonzentration:

$$\text{Korrigierter CTX-II-Wert (ng/mmol)} = [1000 \times \text{CTX-II (}\mu\text{g/L)}] + \text{Kreatinin (mmol/L)}$$

11. Qualitätskontrolle

Die Gute Laborpraxis (GLP) verlangt die Verwendung von Qualitätskontrollproben in jeder Serie von Assays, um die Leistung des Assays zu überprüfen. Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt und die Ergebnisse mit geeigneten statistischen Methoden analysiert werden.

Die beiden im Kit vorgesehenen Kit-Kontrollen sollen dazu dienen, die Validität der erzielten Ergebnisse mit jeder Assay-Platte zu beurteilen.

IDS empfiehlt allen Benutzern, die in jedem Testlauf erzeugten Kontrollwerte einschließlich des Testlauf-Mittelwerts, der Standardabweichung und des prozentualen Variationskoeffizienten in grafischer Form zu protokollieren. Diese Informationen erleichtern die Trendanalyse der Kontrollen in Bezug auf die Leistung der aktuellen und früheren Kontrollchargen im Verhältnis zu den bereitgestellten Qualitätskontrolldaten. Mithilfe des Trends können auch Assays identifiziert werden, die Kontrollwerte ausgeben, welche erheblich von ihrem Durchschnittsbereich abweichen.

Bei der Interpretation von Kontrolldaten sollte der Benutzer beachten, dass dieses Produkt als manuelles Produkt konzipiert und entwickelt wurde. Der Bereich, der in dem Qualitätskontroll-Zertifikat angegeben ist, ist für Assays geeignet, die manuell und unter strikter Einhaltung des oben beschriebenen Assay-Verfahrens durchgeführt werden. In Bezug auf die Qualitätskontrolle ist es allgemein akzeptiert, dass es aufgrund von Unterschieden in den Bedingungen und Praktiken immer eine Variabilität bei den Mittelwerten und der Präzision der Kontrollmessungen zwischen verschiedenen Laboren gibt¹⁸.

12. Messbereich

Nachweisgrenze 0,20 $\mu\text{g/L}$

Die Nachweisgrenze wurde auf 0,20 $\mu\text{g/L}$ festgelegt, was der Konzentration entspricht, die drei Standardabweichungen unter dem Mittelwert von 21 Bestimmungen der Absorption des Urine CartiLaps Standard 0 liegt.

13. Nutzungsbeschränkungen

- Wie bei jedem Diagnoseverfahren müssen die Ergebnisse in Verbindung mit dem Krankheitsbild des Patienten sowie anderen dem Arzt vorliegenden Informationen interpretiert werden.
- Die Leistungsmerkmale dieses Assays wurden nicht in einer pädiatrischen Population etabliert.
- Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen des Reagenzes reagieren und somit *In-vitro*-Immunassays stören¹⁹. Patienten, die regelmäßig Tieren oder Tiereserumprodukten ausgesetzt sind, können gegenüber dieser Interferenz anfällig sein, wodurch unter Umständen anormale Werte zu beobachten sind.
- Die folgenden Substanzen führen zu keinen Störungen des Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA, wenn die Konzentrationen der nachfolgenden Tabelle unter dem angegebenen Grenzwert liegen.

Potenziell interferierende Stoffe	Grenzwert Konzentration
Urea	30 g/L
Kreatinin	10 mg/L
Glucose	5 mg/L
Ascorbinsäure	5 mg/L
Albumin	50 mg/L
Ibuprofen	50 g/L
Acetylsalicylsäure	50 g/L
Paracetamol	50 g/L

14. Erwartete Werte

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Bereich von gesunden und pathologischen CTX-II-Werten festlegt. Als Beispiel sind im Folgenden die geometrischen Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall (CI) für verschiedene Populationen angegeben. Weitere Informationen finden Sie in der Referenzliste am Ende dieser Anleitung.

Population	Anzahl an Patienten	Alter (Jahre)	Mittlere CTX-II-Konzentration (ng/mmol)	95%-CI (ng/mmol)
Alle Frauen	459	20–85	299	79–1137
Prämenopausal	38	20–30	464	103–2086
	165	30–59	200	65–618
	28	48–53	164	66–410
Postmenopausal	38	48–53	318	89–1132
	256	46–85	363	112–1172
Alle Männer	247	22–87	278	87–895
Männer	27	20–30	501	214–1171
	141	30–60	236	89–628
	79	> 60	305	85–1096

Die oben genannten Bereiche gelten nur als Richtlinien. Es wird empfohlen, dass jedes Labor basierend auf seiner eigenen Patientenpopulation eigene Zielwertbereiche festlegt.

15. Leistungsdaten

Repräsentative Leistungsdaten werden angezeigt. Die in individuellen Labors erhaltenen Ergebnisse können sich unterscheiden.

15.1 Präzision

Die Präzision wurde anhand von zehn Analysedurchläufen mit jeweils einer Doppelbestimmung der Urinproben ermittelt.

Probe	Mittlere Konzentration (µg/L)	Intra-Assay		Inter-Assay	
		SD (µg/L)	CV %	SD (µg/L)	CV %
Niedrig	0,52	0,04	7,8	0,06	12,2
Mittel	1,84	0,08	4,6	0,20	10,8
Hoch	5,50	0,28	5,2	0,38	6,9

15.2 Verdünnung/Linearität

Die Verdünnungswiederfindung des Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA wurde mit 96 % bestimmt. Vier Urinproben wurden in Urine CartiLaps Standard 0 verdünnt. Die Konzentration von CTX-II wurde im Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA bestimmt und die Wiederfindung nach Korrektur mit dem Verdünnungsfaktor berechnet.

Verdünnungsfaktor	Wiederfindung (%)				Mittelwert
	1	2	3	4	
1x	100	100	100	100	96
2x	92	104	92	98	
4x	88	105	86	93	
8x	84	104	89	108	

15.3 Spezifität

Das im Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA nachgewiesene Epitop ist hoch konserviert. Daher kann der Test auf Urinproben von vielen anderen Spezies angewendet werden, einschließlich nicht menschlicher Primaten, Rinder, Pferde, Schweine, Kaninchen, Ratten und Mäuse.

16. Verwendete Symbole



Katalognummer



In-vitro-Diagnostikum



Hersteller



Gemäß Richtlinie 98/79/EG angewendet

Rx Only

Achtung: Aufgrund von US-Bundesgesetzen darf dieses Produkt nur durch einen lizenzierten Arzt oder auf dessen Anordnung verkauft werden.
(Nur USA)



EU-Importeur

17. LITERATURHINWEISE

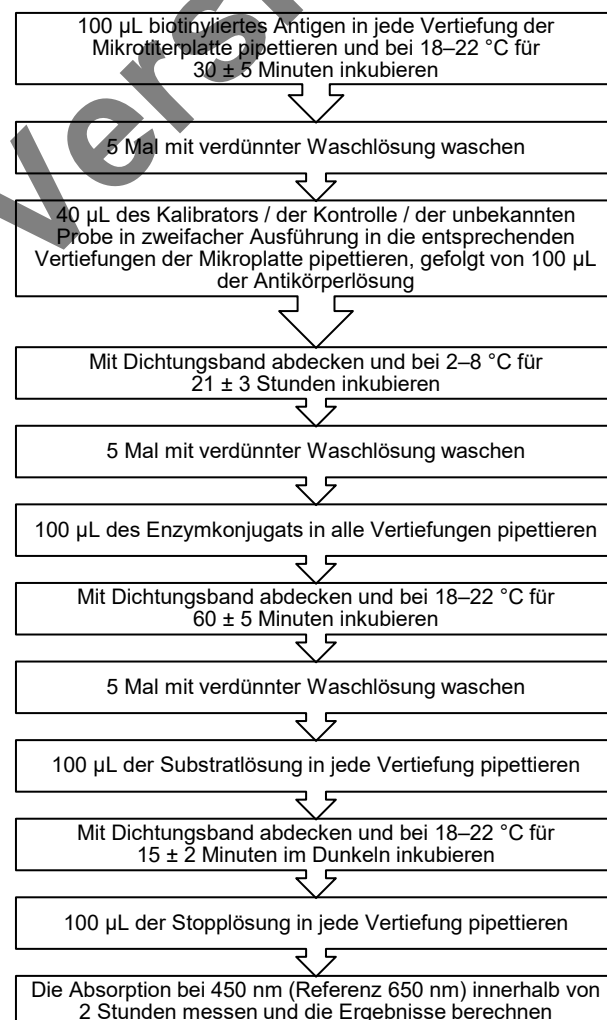
1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2004); 6: R457-68.
6. Garnero P. et al., Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
13. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
14. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
15. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
16. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
17. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.
18. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
19. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited
 10 Didcot Way, Boldon Business Park
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com
 IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany



Assay-Verfahren





Nome prodotto	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Nome prodotto abbreviato	Urine CTX-II EIA		

1. Uso previsto

Per uso diagnostico *in vitro*.

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA è un test immunologico enzimatico per la quantificazione dei prodotti di degradazione dei telopeptidi C-terminali del collagene di tipo II nelle urine umane. I risultati devono essere utilizzati insieme ad altri dati clinici e di laboratorio per l'indicazione della degradazione della cartilagine e possono essere impiegati come ausilio per:

- la valutazione quantitativa dell'attività della malattia (danno strutturale della cartilagine articolare) in pazienti affetti da artrite reumatoide (AR) e osteoartrite (OA)
- prognosi dell'attività della malattia in pazienti affetti da AR e OA, e
- valutazione precoce dell'effetto a lungo termine della terapia nei pazienti affetti da AR

2. Riassunto e spiegazione

La distruzione dell'integrità strutturale della cartilagine è il principale reperto istologico nell'osteoartrite e nell'artrite reumatoide. Il collagene di tipo II è il principale componente organico della cartilagine e i frammenti di collagene di tipo II (CTX-II) entrano in circolazione e successivamente sono secreti nelle urine in seguito alla degradazione della cartilagine. Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA può contribuire a quantificare i frammenti di CTX-II nelle urine.

È stato riportato che Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA si rivela utile nella previsione del decorso dell'osteoartrite¹⁻² e in altre indagini cliniche e precliniche³⁻⁹.

3. Descrizione del metodo

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA si basa sul legame competitivo di un anticorpo monoclonale con frammenti urinari di collagene di tipo II⁴ o con peptidi sintetici biotinilati legati alla superficie di piastre per microtitolazione rivestite con streptavidina.

Inizialmente, i peptidi sintetici biotinilati sono legati alla superficie dei pozzetti rivestiti con streptavidina della piastra per microtitolazione. Dopo il lavaggio, i calibratori, i controlli e i campioni di urina vengono pipettati nei pozzetti seguiti dall'aggiunta dell'anticorpo monoclonale. I pozzetti vengono lavati e viene aggiunta una soluzione di immunoglobulina anti-topo coniugata con perossidasi (coniglio). Dopo il secondo lavaggio, i pozzetti vengono poi incubati con un substrato cromogenico. La reazione viene interrotta e viene misurata l'assorbanza.

4. Avvertenze e precauzioni

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* e non è concepito per l'uso interno nell'uomo o negli animali. Questo prodotto deve essere utilizzato rigorosamente in ottemperanza alle indicazioni riportate nelle presenti istruzioni per l'uso. Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) non è responsabile di eventuali danni o perdite (tranne quanto stabilito dalla legge), di qualsiasi origine, provocate dalla mancata aderenza alle istruzioni fornite.

ATTENZIONE: il presente kit contiene materiale di origine animale. Manipolare i reagenti del kit come potenziali vettori di agenti infettivi. È necessario prendere le opportune precauzioni e seguire le buone prassi di laboratorio nella conservazione, nella manipolazione e nello smaltimento dei reagenti del kit. Lo smaltimento dei reagenti del kit deve essere eseguito nel rispetto delle normative locali vigenti.

Materiali di origine umana

Il materiale di origine umana usato nella preparazione del prodotto è stato testato con metodi raccomandati dalla FDA per la presenza di anticorpi contro i virus dell'immunodeficienza umana (HIV I e II), dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B e di anticorpi contro il virus dell'epatite C, ed è risultato negativo. Poiché nessun metodo può garantire l'assenza totale di questi o altri agenti infettivi, manipolare tutti i reagenti come prescritto per il livello di biosicurezza 2.

Reagenti contenenti azoturo di sodio

Alcuni reagenti presenti nel kit contengono azoturo di sodio (NaN₃) in quantità < 0,1% (p/p) che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature formando azoturi metallici altamente esplosivi. Quando vengono smaltiti, far scorrere abbondante acqua negli scarichi per prevenire un ristagno di azoturo.

Classificazione CLP:

EUH208

Indicazioni di pericolo:

EUH208 Contiene una miscela di:
5-cloro-2-metil-2h-isotiazol-3-one
[n. CE 247-500-7] e 2-metil-2h-isotiazol-3-one
[n. CE 220-239-6]. Può provocare una reazione allergica.

Indicazioni di precauzione:

NA

5. Durata e conservazione dei reagenti

Dopo la consegna, conservare il kit Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA a 2–8 °C. In queste condizioni, il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza e non combinare reagenti provenienti da lotti diversi.

I segni di potenziale deterioramento dei reagenti del kit comprendono:

- Presenza di materia particolata anomala in qualsiasi reagente.
- Diminuzione del legame (binding) massimo.
- Legame non specifico elevato.
- Variazione della pendenza della curva rispetto alla sua posizione normale.

6. Raccolta e conservazione dei campioni

- Per risultati ottimali si raccomanda di utilizzare l'urina della seconda minzione del mattino. È possibile utilizzare un campione puntuale di urina.
- Ai fini del monitoraggio, i campioni di follow-up devono essere raccolti nelle stesse condizioni del campione basale.
- Prima dell'uso, i campioni di urina devono essere agitati e lasciati sedimentare per un minimo di 30 minuti.
- Il campione di urina può essere conservato a 2–8 °C per un massimo di 24 ore; conservare i campioni a -20 °C o a temperatura inferiore per una conservazione più prolungata.
- I campioni palesemente contaminati da sangue intero possono interferire con le prestazioni del test. In tal caso, sarà necessario smaltire i campioni contaminati e prelevare un nuovo campione.

Nota:

- i campioni contenenti particolato devono essere centrifugati prima di eseguire il dosaggio.
- I campioni con contaminazione microbica visibile non devono essere analizzati con il kit.
- Prima di eseguire i test, assicurarsi che i campioni, i calibratori e i controlli siano a temperatura ambiente (18–22 °C).
- Ogni laboratorio deve seguire le linee guida o le disposizioni delle normative locali, regionali e/o nazionali o delle organizzazioni di accreditamento per definire la stabilità di manipolazione e di conservazione dei propri campioni. Per informazioni sulle prassi più appropriate, fare riferimento al documento CLSI GP44-A4, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests".

7. Materiali

Materiali forniti

MICROPLAT

Piastra per microtitolazione rivestita con streptavidina

Strisce di micropozzetti (12 × 8 pozzetti) pre-rivestiti con streptavidina. Fornite in un telaio di plastica.

CAL0

Calibratore

Soluzione tamponata pronta all'uso con stabilizzatore di proteine, detergente e conservante; 1 flaconcino, 3,0 mL.

CAL 1 -5

Calibratori

Soluzione tamponata pronta all'uso contenente un peptide sintetico con stabilizzatori di proteine, detergente e conservante; 1 flaconcino per ciascuno dei 5 livelli di concentrazione, 0,4 mL per flaconcino. Il valore esatto di ogni standard è stampato sul rapporto del controllo qualità.

CTRL 1 - 2

Controlli

Soluzione tamponata pronta all'uso contenente un peptide sintetico con stabilizzatori di proteine, detergente e conservante; 1 flaconcino per ciascuno dei 2 livelli di concentrazione, 0,4 mL per flaconcino. Gli intervalli stabiliti per i controlli sono stampati sul rapporto del controllo qualità.

Ag BIOTIN

Antigene biotinitato

Peptide sintetico biotinitato preparato in una soluzione tamponata con stabilizzatore di proteine, detergente e conservante; 1 flaconcino, 12,0 mL.

Ab

Anticorpo primario

Soluzione tamponata pronta all'uso contenente anticorpo monoclonale con stabilizzatore di proteine, detergente, conservante e colorante rosso; 1 flaconcino, 12,0 mL.

ENZYMCONJ

Anticorpo coniugato con perossidasi

Immunoglobuline anti-topo coniugate con perossidasi (coniglio) pronte all'uso in una soluzione tamponata con stabilizzatore di proteine, detergente, conservante e colorante blu; 1 flaconcino, 12,0 mL.

SUBS TMB

Soluzione substrato

Substrato di tetrametilbenzidina (TMB) pronto all'uso in un tampone acido; 1 flaconcino, 12,0 mL. Si precisa che il substrato cromogenico potrebbe apparire leggermente bluastro.

H₂SO₄

Soluzione di arresto

Soluzione pronta all'uso di acido solforico alla concentrazione di 0,18 mol/L; 1 flaconcino, 12,0 mL.

WASHBUF 50x

Tampone di lavaggio

Tampone di lavaggio concentrato con detergente e conservante; 1 flaconcino, 20,0 mL.

Sigillante adesivo per piastra Pellicola adesiva per coprire i pozzetti durante l'incubazione.

Documentazione: istruzioni per l'uso e rapporto del controllo qualità.

Materiali richiesti – non forniti

- Contenitori per la preparazione della soluzione di lavaggio
- Dispositivi di pipettaggio di precisione per erogare 40 µL
- Acqua distillata
- Multipipetta di precisione a 8 o 12 canali per erogare da 100 µL a 300 µL
- Agitatore vortex
- Lavatore automatico per micropiastre (opzionale)
- Lettore fotometrico di micropiastre e apparecchiatura per l'analisi dei dati

8. Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso attendere almeno 60 minuti affinché tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (18–22 °C). Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi.

Preparazione del tampone di lavaggio

Preparare il tampone aggiungendo 1 parte di soluzione concentrata di lavaggio **WASHBUF 50x** a 50 parti di acqua distillata.

Tutti gli altri reagenti sono forniti pronti all'uso.

N.B. Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere rimessi nei flaconcini originali.

9. Procedura di dosaggio

Preparare i reagenti come descritto nel § 8. Preparazione dei reagenti. Prima dell'uso, miscelare tutti i reagenti e i campioni (evitare la formazione di schiuma).

NOTA: aderire scrupolosamente alla seguente procedura per garantire risultati coerenti al variare della corsa e dell'utilizzatore, nonché per ridurre al minimo eventuali effetti di deviazione:

- a. Attendere che tutti i reagenti siano a temperatura ambiente (18–22 °C) prima dell'uso: saranno necessari circa 60 minuti.
- b. Sigillare la piastra durante le fasi di incubazione usando i sigillanti per piastra forniti in dotazione con il kit di dosaggio.
- c. Non impilare le piastre durante l'incubazione al fine di garantire che la temperatura sia uguale per tutte le piastre.
- d. Durante le fasi di lavaggio non riempire i pozzetti di dosaggio in modo eccessivo o insufficiente.
- e. Aggiungere i reagenti utilizzando ogni volta la stessa sequenza per ridurre la deviazione temporale tra le diverse reazioni.

Non pipettare direttamente dal flaconcino contenente il substrato TMB. Il volume richiesto deve essere prima trasferito in un contenitore pulito. La soluzione rimasta nel contenitore deve essere scartata dopo l'uso e NON deve essere reinserita nel flaconcino della soluzione madre **SUBS TMB**

Determinare il numero di strisce necessario per il dosaggio; si raccomanda di testare tutti i campioni in duplicato. Inoltre, per ogni corsa occorre utilizzare un totale di 16 pozzetti per gli standard e i controlli. Inserire il numero adeguato di strisce nella cornice di plastica. Conservare le strisce non utilizzate nel sacchetto di alluminio chiuso ermeticamente con capsule essiccanti all'interno.

1. Aggiungere 100 µL di antigene biotinitato **Ag BIOTIN** in ogni pozzetto, coprire con nastro sigillante e incubare per 30 ± 5 minuti a temperatura ambiente (18–22 °C) senza agitare.
2. Lavare tutti i pozzetti 5 volte con il tampone di lavaggio

Lavaggio automatico delle piastre	Impostare il lavatore di piastre per l'erogazione di 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto Riempire e aspirare per 5 cicli
Lavaggio manuale	Far decantare il contenuto dei pozzetti capovolgendoli con decisione Pipettare 300 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto, far decantare e ripetere 5 volte Rimuovere il tampone di lavaggio in eccesso picchiando con decisione su una salvietta assorbente prima di procedere

Assicurarsi che i pozzetti siano completamente svuotati dopo ogni ciclo di lavaggio manuale o automatico.
Una volta terminato il lavaggio, procedere immediatamente al passaggio successivo.
3. Pipettare 40 µL di calibratori **CAL 0 – 5**, di controlli **CTRL 1 - 2** o di campioni sconosciuti nei pozzetti appropriati, seguiti da 100 µL di soluzione anticorpale **Ab**.
4. Coprire le immunostrip con nastro sigillante e incubare per 21 ± 3 ore a 2–8 °C senza agitare.
5. Lavare tutti i pozzetti come descritto nel passaggio 2.
6. Aggiungere 100 µL di anticorpo coniugato con perossidasi **ENZYMCONJ** in ogni pozzetto.
7. Coprire le immunostrip con nastro sigillante e incubare per 60 ± 5 minuti a temperatura ambiente (18–22 °C) senza agitare.
8. Lavare tutti i pozzetti come descritto nel passaggio 2.
9. Pipettare 100 µL di soluzione di substrato **SUBS TMB** in ogni pozzetto e incubare per 15 ± 2 minuti a temperatura ambiente (18–22 °C) al buio. Utilizzare il nastro sigillante.

NOTA: non pipettare direttamente dal flaconcino contenente il substrato TMB. Il volume richiesto deve essere prima trasferito in un contenitore pulito. La soluzione rimasta nel contenitore deve essere scartata dopo l'uso e NON deve essere reinserita nel flaconcino della soluzione madre **SUBS TMB**
10. Pipettare 100 µL di soluzione di arresto **H₂SO₄** in ogni pozzetto.
11. Misurare l'assorbanza a 450 nm con 650 nm come riferimento entro due ore.

N.B. I lettori di micropiastre misurano in posizione verticale; quando si pipetta, non toccare il fondo dei pozzetti.

Piattaforme automatiche

Il kit Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA è stato progettato e sviluppato per eseguire il dosaggio manualmente secondo il protocollo descritto in precedenza. Il protocollo non si applica necessariamente a tutte le piattaforme automatiche.

Se si utilizzano piattaforme automatiche è responsabilità dell'utente assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente testato. Per migliorare le prestazioni del kit su piattaforme automatiche, si raccomanda di aumentare il numero di cicli di lavaggio di ogni fase di lavaggio.

10. Calcolo dei risultati

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. Occorre utilizzare una curva logistica a 4 parametri.

Se l'assorbanza di un campione pre-diluito supera quella del **Calibratore 5**, il campione deve essere diluito nel **Calibratore 0** e nuovamente analizzato.

Per ogni campione di urina, la concentrazione di Urine CTX-II EIA CrossLaps (µg/L) e la concentrazione di creatinina (mM = mmol/L) devono essere determinate utilizzando un metodo colorimetrico enzimatico per analizzatore di chimica clinica.

La seguente equazione corregge la concentrazione di CTX-II per la variazione della concentrazione nelle urine:

$$\text{Valore CTX-II corretto (ng/mmol)} = [1.000 \times \text{CTX-II (}\mu\text{g/L)}] \div \text{creatinina (mmol/L)}$$

11. Controllo della qualità

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I due controlli forniti nel kit hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

IDS raccomanda agli utilizzatori di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, compresi medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo della qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato di controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi¹⁸.

12. Intervallo di misurazione

Limite di rilevamento 0,20 µg/L

Il limite di rilevamento è risultato pari a 0,20 µg/L, che è la concentrazione corrispondente a tre deviazioni standard al di sotto della media di 21 determinazioni dell'assorbanza di Urine CartiLaps Standard 0.

13. Limitazioni d'uso

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*¹⁹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.
- Le seguenti sostanze non interferiscono con Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA fino alle concentrazioni riportate nella tabella seguente.

Agente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Urea	30 g/L
Creatinina	10 mg/L
Glucosio	5 mg/L
Acido ascorbico	5 mg/L
Albumina	50 mg/L
Ibuprofene	50 g/L
Acido acetilsalicilico	50 g/L
Paracetamolo	50 g/L

14. Valori attesi

È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca il proprio range di valori di CTX-II normali e patologici. A titolo di esempio, di seguito sono forniti i valori geometrici medi e l'intervallo di confidenza (IC) al 95% per varie popolazioni. Per ulteriori informazioni, fare riferimento alla bibliografia riportata alla fine di queste istruzioni.

Popolazione	N. di soggetti	Età (anni)	CTX-II medio (ng/mmol)	IC 95% (ng/mmol)
Tutte le donne	459	20–85	299	79–1.137
Premenopausa	38	20–30	464	103–2.086
	165	30–59	200	65–618
Postmenopausa	28	48–53	164	66–410
	38	48–53	318	89–1.132
Tutti gli uomini	256	46–85	363	112–1.172
	247	22–87	278	87–895
Uomini	27	20–30	501	214–1.171
	141	30–60	236	89–628
	79	> 60	305	85–1.096

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

15. Dati relativi alle prestazioni

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

15.1 Precisione

La precisione è stata determinata utilizzando dieci corse analitiche, ciascuna con determinazioni duplicate di campioni di urina.

Campione	Conc. media (µg/L)	Intra-dosaggio		Inter-dosaggio	
		DS (µg/L)	CV %	DS (µg/L)	CV %
Basso	0,52	0,04	7,8	0,06	12,2
Medio	1,84	0,08	4,6	0,20	10,8
Alto	5,50	0,28	5,2	0,38	6,9

15.2 Diluizione/linearità







Il recupero della diluizione di Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA è risultato pari al 96%. Quattro campioni di urina sono stati diluiti in Urine CartiLaps Standard 0. La concentrazione di CTX-II è stata determinata in Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA e il recupero è stato calcolato dopo la correzione con il fattore di diluizione.

Fattore di diluizione	Recupero (%)				Media
	1	2	3	4	
1 x	100	100	100	100	96
2 x	92	104	92	98	
4 x	88	105	86	93	
8 x	84	104	89	108	

15.3 Specificità

L'epitopo rilevato in Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA è altamente conservato, pertanto il test può essere eseguito su campioni di urina di molte altre specie, compresi primati non umani, bovini, cavalli, maiali, conigli, ratti e topi.

16. Simboli utilizzati

	Numero di catalogo
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Produttore
	Applicato in conformità alla Direttiva 98/79/CE
	Attenzione: la legge federale limita la vendita del presente dispositivo da parte di o su ordine di un (operatore sanitario autorizzato). (Solo per gli USA)
	Importatore UE

17. BIBLIOGRAFIA

1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2004); 6: R457-68.
6. Garnero P. et al., Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
13. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
14. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
15. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
16. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
17. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.
18. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
19. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited
 10 Didcot Way, Boldon Business Park
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com
 IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany



Procedura di dosaggio

Pipettare 100 µL di antigene biotinilato in ogni pozzetto della micropietra e incubare a 18–22 °C per 30 ± 5 minuti

Lavare 5 volte con la soluzione di lavaggio diluita

Pipettare 40 µL di calibratore/controllo/campione sconosciuto, in duplicato, nei pozzetti appropriati della micropietra, seguiti da 100 µL di soluzione anticorpale

Coprire con nastro sigillante e incubare a 2–8 °C per 21 ± 3 ore

Lavare 5 volte con la soluzione di lavaggio diluita

Pipettare 100 µL di coniugato enzimatico in tutti i pozzetti

Coprire con nastro sigillante e incubare a 18–22 °C per 60 ± 5 minuti

Lavare 5 volte con la soluzione di lavaggio diluita

Pipettare 100 µL di soluzione substrato in ogni pozzetto

Coprire con nastro sigillante e incubare a 18–22 °C per 15 ± 2 minuti al buio

Pipettare 100 µL di soluzione di arresto in ogni pozzetto

Misurare l'assorbanza a 450 nm (riferimento 650 nm) entro 2 ore e calcolare i risultati



Brugsanvisning

Produktnavn	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Forkortet produktnavn	Urine CTX-II EIA		

1. Beregnet brug

Til *In Vitro*-diagnostisk brug.

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA er en enzymimmunologisk test til kvantificering af nedbrydningsprodukter af C-terminale telopeptider af type II-kollagen i human urin. Resultaterne skal anvendes sammen med andre kliniske data og laboratoriedata som indikation på nedbrydning af brusk og kan anvendes som hjælp til:

- kvantitativ vurdering af sygdomsaktivitet (strukturel beskadigelse af ledbrusk) hos patienter med osteoarthritis (RA) og osteoarthritis (OA)
- prognose for sygdomsaktivitet hos patienter med RA og OA og
- tidlig vurdering af den langsigtede effekt af behandlingen hos patienter med RA

2. Oversigt og forklaring

Forstyrrelser i bruskens strukturelle integritet er det vigtigste histologiske fund ved osteoarthritis og osteoarthritis. Type II-kollagen er den vigtigste organiske bestanddel af brusk. Efter nedbrydning af brusk frigives fragmenter af type II-kollagen (CTX-II) til kredsløbet og udskilles efterfølgende med urinen. I urinen kan CTX-II-fragmenterne kvantificeres ved hjælp af Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA.

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA er blevet rapporteret at være nyttig til forudsigelse af udviklingen af osteoarthritis¹⁻² og i andre kliniske og prækliniske undersøgelser³⁻⁹.

3. Metodebeskrivelse

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA er baseret på kompetitiv binding af et monoklonalt antistof til fragmenter af type II-kollagen⁴ i urinen eller til biotinylerede syntetiske peptider bundet til overfladen af mikrotitreplader beklædt med streptavidin.

Indledningsvis bindes biotinylerede syntetiske peptider til overfladen af streptavidinbeklædte brønde i mikrotiterpladen. Efter vask pipetteres kalibratorer, kontroller og urinprøver ned i brøndene, efterfulgt af tilsætning af det monoklonale antistof. Brøndene vaskes, og der tilsættes en opløsning af peroxidasekonjugeret anti-mus immunoglobulin (kanin) til brøndene. Efter det andet vasketrin inkuberes brøndene med et kromogent substrat. Reaktionen stoppes, og absorbansen måles.

4. Advarsler og forholdsregler

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA er udelukkende beregnet til *in vitro*-diagnostisk brug og er ikke til indvortes brug hos mennesker og dyr. Dette produkt skal bruges i fuldstændig overensstemmelse med anvisningerne i denne brugsanvisning. Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) kan ikke holdes ansvarlig for noget tab eller nogen skader (medmindre dette er bestemt ved lov), uanset hvordan disse er opstået, hvis de skyldes manglende overholdelse af den udleverede brugsanvisning.

FORSIGTIG: Dette sæt indeholder materiale af animalsk oprindelse. Håndter sættets reagenser, som om de er i stand til at overføre et smitsomt stof. Passende forholdsregler og god laboratoriepraksis skal overholdes, hvad angår opbevaring, håndtering og bortskaffelse af sættets reagenser. Bortskaffelse af sættets reagenser skal foregå i overensstemmelse med lokale bestemmelser.

Humane materialer

Humant materiale anvendt i fremstillingen af dette produkt er testet i analyser anbefalet af FDA i henseende til forekomst af antistoffer mod human immunodefektvirus (HIV I og II), hepatitis B overfladeantigen samt antistof mod hepatitis C, og er fundet negativ. Eftersom ingen test kan give fuld sikkerhed for, at der ikke findes smitstoffer, skal reagenserne behandles i henhold til biosikkerhed niveau 2.

Reagenser med indhold af natriumazid

Nogle reagenser i dette sæt indeholder natriumazid (NaN_3) < 0,1 % (w/w), som kan reagere med bly, kobber eller messing og danne meget eksplosive metalazider. Ved bortskaffelse skal der skylles med rigelige mængder vand for at forhindre dannelse af azider.

Klassificering under CLP:
EUH208

Faresætninger:

EUH208 Indeholder en blanding af:
5-chloro-2-methyl-2h-isothiazol-3-one
[ec no 247-500-7] og 2-methyl-2h-isothiazol-3-one
[ec no 220-239-6]. Kan udløse allergisk reaktion.

Sikkerhedssætninger:

Ikke relevant

5. Holdbarhed og opbevaring af reagenser

Ved modtagelsen skal Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-sættet opbevares ved 2-8 °C. Under disse betingelser er sættet stabilt indtil den udløbsdato, der er angivet på æsken.

Anvend ikke nogen af sættets komponenter efter udløbsdatoen, og bland ikke reagenser fra forskellige partier.

Tegn på mulig nedbrydning af sættets reagenser omfatter:

- Tilstedeværelse af abnorme partikler i nogen af reagenserne.
- Et fald i den maksimale binding.
- En høj ikke-specifik binding.
- En ændring i kurvens hældning fra dens normale position.

6. Prøveopsamling og opbevaring

- Af hensyn til at sikre optimale resultater anbefales det at bruge urin fra den anden morgentømning. Der kan anvendes stikprøveurin.
- I forbindelse med monitorering bør opfølgende prøver indsamles under samme forhold som baselineprøven.
- Før brug skal urinprøverne omrystes og sedimentere i mindst 30 minutter.
- Urinprøven kan opbevares ved 2-8 °C i højst 24 timer. Opbevar prøverne ved -20 °C eller lavere ved længere opbevaring.
- Prøver, der tydeligt er kontamineret med fuldblod, kan forstyrre analysens ydeevne. Disse prøver bør kasseres og en ny prøve indsamles.

Bemærk:

- Prøver, der indeholder partikler skal centrifugeres, inden analysen udføres.
- Prøver, der udviser mikrobiel kontaminering bør ikke analyseres med sættet.
- Inden analyse foretages, skal det sikres, at prøver, kalibratorer og kontrolprøver har stuetemperatur (18-22 °C).
- Alle laboratorier skal følge de retningslinjer eller krav, der findes i lokale, statslige og/eller regionale bestemmelser eller hos akkrediteringsorganisationerne, for at etablere deres egen prøvehåndtering og opbevaringsstabilitet. For vejledning i passende praksis henvises der til CLSI GP44-A4, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests".

7. Materialer

Leverede materialer

MIKROPLADE	Streptavidinbelagt mikrotiterplade Mikrobrøndrækker (12 x 8 brønde) beklædt med streptavidin. Leveres i plastramme.
CAL0	Kalibrator Bufferopløsning med proteinstabilisator, detergent og konserveringsmiddel, klar til brug. 1 hætteglas, 3,0 mL
CAL 1 - 5	Kalibratorer Bufferopløsning med et syntetisk peptid med proteinstabilisatorer, detergent og konserveringsmiddel. 1 for hver 5 koncentrationniveauer, 0,4 mL pr. hætteglas Den nøjagtige værdi for hver standard fremgår af QC-rapporten.
CTRL 1 - 2	Kontroller Bufferopløsning med et syntetisk peptid med proteinstabilisatorer, detergent og konserveringsmiddel. 1 for hver 2 koncentrationniveauer, 0,4 mL pr. hætteglas De fastlagte områder for kontrollerne fremgår af QC-rapporten.
Ab BIOTIN	Biotinylet antigen Biotinylet syntetisk peptid forberedt i en bufferopløsning med proteinstabilisator, detergent og konserveringsmiddel. 1 hætteglas, 12,0 mL
Ab	Primært antistof Bufferopløsning med monoklonalt antistof med proteinstabilisator, detergent, konserveringsmiddel og rødt farvestof. 1 hætteglas, 12,0 mL
ENZYMCNJ	Peroxidasekonjugeret antistof Peroxidasekonjugeret antimus immunoglobulin (kanin) i bufferopløsning med proteinstabilisator, detergent, konserveringsmiddel og blåt farvestof. 1 hætteglas, 12,0 mL.
SUBS TMB	Substratopløsning Tetramethylbenzidin (TMB) substrat i en syreholdig buffer, klar til brug. 1 hætteglas, 12,0 mL Bemærk, at det kromogene substrat kan fremstå let blåligt.
H₂SO₄	Stopopløsning Svovlsyreopløsning på 0,18 mol/L, klar til brug. 1 hætteglas, 12,0 mL
WASHBUF 50x	Vaskebuffer Koncentreret vaskebuffer med detergent og konserveringsmiddel. 1 hætteglas, 20,0 mL

Pladeforseglingsklæbefolie Klæbefolie til afdækning af brønde under inkubation.

Dokumentation Brugsanvisning og QC-rapport.

Nødvendig materialer – medfølger ikke

- Beholdere til forberedelse af vaskeopløsningen
- Præcisionspipetteringsudstyr til levering af 40 µL
- Destilleret vand
- Præcisionsmultipipette med 8 eller 12 kanaler til levering af 100 µL til 300 µL
- Vortexblander
- Automatisk mikropladevasker (ekstraudstyr)
- Fotometrisk mikropladelæser og dataanalyseudstyr

8. Klargøring af reagenser

Lad alle reagenser opnå stuetemperatur (18-22 °C) i mindst 60 minutter før brug. Undlad at udskifte sætkomponenter fra forskellige partier.

Tilberedning af vaskebuffer

Klargør ved at tilføje 1 del vaskekonzentrat **WASHBUF 50x** til 50 dele destilleret vand.

Alle andre reagenser leveres klar til brug.

N.B. Undgå potentiel mikrobiel og/eller kemisk kontaminering: Ubrugte reagenser må aldrig returneres til de originale hætteglas.

9. Fremgangsmåde for analyse

Klargør reagenser som beskrevet i § 8. Klargøring af reagenser. Bland alle reagenser og prøver før brug (undgå dannelse af skum).

BEMÆRK: For at sikre ensartede resultater mellem kørsler og mellem operatører, og for at minimere eventuel afdrift skal følgende procedure strengt overholdes:

- a. Lad alle reagenser nå stuetemperatur (18-22 °C) før brug – dette vil tage ca. 60 minutter.
- b. Forsegl pladen under inkubationer ved hjælp af de pladeforseglere, som leveres i sættet.
- c. Stak ikke pladerne under inkubationen for at sikre ensartet temperatur for alle plader.
- d. Pas på ikke at under- eller overfylde analysebrøndene under vasketrinnene.
- e. Tilsæt reagenser i samme rækkefølge hver gang for at reducere tidsafvigelse mellem reaktioner

Undgå at pipettere direkte fra hætteglasset med TMB-substrat. Den nødvendige volumen skal først overføres til en ren beholder. Opløsning, der er tilbage i beholderen, skal kasseres efter brug og IKKE returneres til lagerhætteglasset **SUBS TMB**

Afgør, hvor mange rækker, der skal bruges til analysen. Det anbefales at teste alle prøver i to eksemplarer. Desuden er der behov for i alt 16 brønde til standarder og kontroller i hver kørsel. Anbring det relevante antal rækker i plastrammen. Opbevar eventuelle ubrugte rækker i den tæt lukkede foliepose med tørremiddelkapsler.

1. Tilsæt 100 µL biotinyleret antigen **Ag BIOTIN** til hver brønd. Dæk med forseglingsstape, og inkuber i 30 ± 5 minutter ved stuetemperatur (18-22 °C) uden at ryste.
2. Vask alle brønde 5 gange med vaskebuffer.

Automatisk pladevask	Indstil pladevaskeren til at dispensere 300 µL vaskeopløsning pr. brønd
	Fyld og aspirer i 5 cyklusser
Manuel vask	Dekanter indholdet af brøndene ved at vende dem hurtigt op og ned
	Pipetter 300 µL vaskeopløsning i hver brønd, dekanter, og gentag 5 gange
	Fjern overskydende vaskebuffer ved at banke hårdt på det absorberende væv, før der fortsættes
	Sørg for, at brøndene tømmes helt efter hver manuel eller automatisk vaskecyklus.
	Fortsæt straks til næste trin, når vaskecyklussen er afsluttet.
3. Pipetter 40 µL kalibratorer **CAL 0 – 5**, kontroller **CTRL 1 - 2** eller ukendte prøver i de respektive brønde, fulgt af 100 µL af antistopopløsningen **Ab**.
4. Tildæk immunstrimlerne med forseglingsstape, og inkuber i 21 ± 3 timer ved 2-8 °C uden at ryste.
5. Vask alle brønde som i trin 2
6. Tilsæt 100 µL af det peroxidasekonjugerede antistof **ENZYMCONJ** til hver brønd.
7. Tildæk immunstrimlerne med forseglingsstape, og inkuber i 60 ± 5 minutter ved stuetemperatur (18-22 °C) uden at ryste.
8. Vask alle brønde som i trin 2
9. Pipetter 100 µL substratopløsning **SUBS TMB** i hver brønd, og inkuber i mørke i 15 ± 2 minutter ved stuetemperatur (18-22 °C). Brug forseglingsstape.

BEMÆRK: Undgå at pipettere direkte fra hætteglasset med TMB-substrat. Den nødvendige volumen skal først overføres til en ren beholder. Opløsning, der er tilbage i beholderen, skal kasseres efter brug og IKKE returneres til lagerhætteglasset **SUBS TMB**
10. Pipetter 100 µL stopopløsning **H₂SO₄** i hver brønd.
11. Mål absorbansen ved 450 nm med 650 nm som reference inden for to timer.

N.B. Mikropladelæsere måler lodret. Under pipettering skal du undgå at røre bunden af brøndene

Automatiserede platforme

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-sættet er designet og udviklet til manuel udførelse ved hjælp af protokollen, som er beskrevet ovenfor. Protokollen er ikke nødvendigvis anvendelig til automatiserede platforme.

Hvis der anvendes automatiserede platforme, er det brugerens ansvar at sikre, at sættet er blevet korrekt testet. For at forbedre ydeevnen af sættet på automatiserede platforme anbefales det at øge antallet af vaskecyklusser ved hvert vasketrin.

10. Beregning af resultater

En række forskellige softwarepakker til datareduktion er tilgængelige, som kan bruges til at generere middelkalibreringskurven og beregne middelkoncentrationerne af ukendte prøver og kontroller. Der bør anvendes en logistisk kurve med 4 parametre.

Hvis absorbansen af en fortyndet prøve er højere end **kalibrator 5**, så skal prøven fortyndes i **kalibrator 0** og analyseres igen.

For hver urinprøve bør Urine CTX-II EIA CrossLaps-koncentrationen (µg/L) og kreatininkoncentrationen (mM= mmol/L) bestemmes ved hjælp af en enzymatisk kolometrisk metode til klinisk-kemiske analyser.

Den følgende ligning korrigerer CTX-II-koncentrationen for variation i urinkoncentrationen:

$$\text{Korrigeret CTX-II-værdi (ng/mmol)} = [1000 \times \text{CTX-II (}\mu\text{g/L)}] \div \text{kreatinin (mmol/L)}$$

11. Kvalitetskontrol

God laboratoriepraksis (GLP) kræver brug af kvalitetskontrolprøver i hver serie af analyser for at kontrollere analysens ydeevne. Kontroller bør behandles som ukendte prøver, og resultaterne analyseres med passende statistiske metoder.

De to sætkontroller i sættet er beregnet til at hjælpe med at vurdere gyldigheden af opnåede resultater for hver analyseplade.

IDS anbefaler brugerne at føre grafiske optegnelser over de kontrolværdier, som genereres med hver analysekørsel, inklusive løbende middelværdier, SD'er og %CV'er. Denne information vil lette tendensanalysen af kontrollerne i forhold til ydelsen af de aktuelle og historiske kontroller i forhold til de angivne QC-data. Tendensanalysen vil bidrage til identifikationen af analyser, som giver kontrolværdier, som afviger markant fra deres gennemsnitlige område.

Ved tolkning af kontroldata skal brugerne være opmærksom på, at dette produkt er designet og udviklet som et manuelt produkt. Intervallet angivet på QC-certifikatet burde være passende for analyser, som udføres manuelt og under nøje overholdelse af den ovenfor beskrevne analyseprocedure. Fagfolk inden for kvalitetskontrol erkender, at middelværdier og præcision af kontrolmålinger som følge af forskelle i forhold og fremgangsmåder altid vil variere fra det ene laboratorium til det andet¹⁸.

12. Måleområde

Påvisningsgrænse 0,20 µg/L

Påvisningsgrænsen blev fastsat til 0,20 µg/L, hvilket er den koncentration der svarer til tre standardafvigelser under gennemsnittet af 21 bestemmelser af absorbansen af Urine CartiLaps Standard 0.

13. Begrænsninger for brug

- Som ved enhver diagnostisk procedure skal resultaterne fortolkes i sammenhæng med patientens kliniske tilstand og andre oplysninger, som lægen har adgang til.
- Ydeevnekaraktistikaene ved denne analyse er ikke etableret i en pædiatrisk population.
- Heterofile antistoffer i humant serum kan reagere med reagensets immunoglobulin og gribe forstyrrende ind i *in vitro*-immunoanalyser¹⁹. Patienter, der jævnligt udsættes for dyr eller animalske serumprodukter, kan være disponerede for denne interferens, hvorfor anormale værdier kan forekomme.
- Følgende stoffer påvirker ikke Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-analysen, når koncentrationerne i den følgende tabel ligger under den angivne grænse.

Potentielt interfererende stof	Koncentrationstærskel
Urinstof	30 g/L
Kreatinin	10 mg/L
Glukose	5 mg/L
Ascorbinsyre	5 mg/L
Albumin	50 mg/L
Ibuprofen	50 g/L
Acetylsalicylsyre	50 g/L
Paracetamol	50 g/L

14. Forventede værdier

Det tilrådes, at hvert laboratorium bestemmer sit eget område for sunde og patologiske CTX-II-værdier. Som et eksempel er de geometriske middelværdier og 95 %-konfidensintervallet for forskellige populationer angivet nedenfor. For yderligere oplysninger henvises til referencelisten i slutningen af denne vejledning.

Population	Antal forsøgspersoner	Alder (år)	Gennemsnitlig CTX-II (ng/mmol)	95 % CI (ng/mmol)
Alle kvinder	459	20-85	299	79-1137
Præmenopausal	38	20-30	464	103-2086
	165	30-59	200	65-618
	28	48-53	164	66-410
Postmenopausal	38	48-53	318	89-1132
	256	46-85	363	112-1172
Alle mænd	247	22-87	278	87-895
Mand	27	20-30	501	214-1171
	141	30-60	236	89-628
	79	> 60	305	85-1096

Intervallerne herover skal betragtes som kun vejledende. Det anbefales, at hvert laboratorium etablerer sit eget forventede interval på grundlag af laboratoriets egen patientpopulation.

15. Ydeevnedata

Der vises repræsentative ydeevnedata. Resultaterne, der opnås på de enkelte laboratorier, kan variere.

15.1 Præcision

Præcisionen blev bestemt ved hjælp af 10 analysekørsler, hver med dobbeltbestemmelse af urinprøver.

Prøve	Gnsn. konc. (µg/L)	Intraanalyse		Interanalyse	
		SD (µg/L)	CV%	SD (µg/L)	CV%
Lav	0,52	0,04	7,8	0,06	12,2
Middel	1,84	0,08	4,6	0,20	10,8
Høj	5,50	0,28	5,2	0,38	6,9

15.2 Fortynding/linearitet

Fortyndingsgenvinding af Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA blev bestemt til 96 %. Fire urinprøver blev fortyndet i Urine CartiLaps Standard 0. Koncentrationen af CTX-II blev bestemt i Urine CartiLaps® (CTX-II)-EIA, og genvinding blev beregnet efter korrektion med fortyndingsfaktoren.

Fortyndingsfaktor	Genvinding (%)				Middelværdi
	1	2	3	4	
1 x	100	100	100	100	96
2 x	92	104	92	98	
4 x	88	105	86	93	
8 x	84	104	89	108	

15.3 Specificitet

Den epitop, der påvises med Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA, er meget velbevaret. Derfor kan testen anvendes på urinprøver af mange andre arter, herunder ikke-humane primater, kvæg, heste, svin, kaniner, rotter og mus.

16. Anvendte symboler



Katalognummer



In vitro-diagnostisk udstyr



Producent



Anvendes i overensstemmelse med direktiv 98/79/EC

Rx Only

.Den amerikanske lovgivning begrænser denne enhed til kun at måtte sælges af eller på foranledning af en (godkendt sundhedsfaglig). (Kun for USA)



EU Importør

17. REFERENCER

1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2004); 6: R457-68.
6. Garnero P. et al., Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
13. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
14. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
15. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
16. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
17. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.
18. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
19. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited
 10 Didcot Way, Boldon Business Park
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com
 IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany



Fremgangsmåde for analyse





Bruksanvisning

Produktnamn	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Förkortat produktnamn	Urine CTX-II EIA		

1. Avsedd användning

För *in vitro*-diagnostik.

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA är ett enzymimmunologiskt test för kvantifiering av nedbrytningsprodukter av C-terminala telopeptider av typ II-kollagen i urin från människa. Resultaten skall användas tillsammans med andra kliniska data och laborierdata för indikationen brosknedbrytning. De kan användas som stöd för:

- kvantitativ bedömning av sjukdomsaktivitet (strukturell skada på ledbrosk) hos patienter med RA och OA
- prognos för sjukdomsaktivitet hos patienter med RA och OA, och
- tidig bedömning av behandlingens långtidseffekt hos patienter med RA

2. Sammanfattning och förklaring

Störningar av broskets strukturella integritet är det viktigaste histologiska fyndet vid artros och reumatoid artrit. Kollagen typ II är den viktigaste organiska beståndsdel i brosk och fragment av kollagen typ II (CTX-II) släpps vid brosknedbrytning ut i omlopp och utsöndras därefter i urinen. I urin kan CTX-II-fragmenten kvantifieras av Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA.

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA har rapporterats vara användbart för att förutsäga artrosprogression¹⁻² och vid andra kliniska och prekliniska undersökningar³⁻⁹.

3. Beskrivning av metod

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA är baserad på kompetitiv bindning av en monoklonal antikropp till fragment av typ II-kollagen⁴ i urin eller till biotinylerade syntetiska peptider bundna till ytan av mikrotiterplattor belagda med streptavidin.

Inledningsvis är biotinylerade syntetiska peptider bundna till ytan av streptavidinbelagda brunnar på mikrotiterplattan. Efter tvätt pipetteras kalibratorer, kontroller och urinprover i brunnarna och sedan tillsätts den monoklonala antikroppen. Brunnarna tvättas och en lösning av peroxidaskonjugerat anti-mus-immunglobulin (kanin) tillsätts i brunnarna. Efter det andra tvättsteget inkuberas brunnarna med ett kromogent substrat. Reaktionen stoppas och absorbansen mäts.

4. Varningar och försiktighetsåtgärder

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA är avsedd för *in vitro*-diagnostisk användning, inte för internt bruk i människor eller djur. Denna produkt får endast användas i strikt överensstämmelse med anvisningarna som anges i denna bruksanvisning. Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) påtar sig inget ansvar för eventuell förlust eller skada (utom där det krävs enligt lag) oavsett orsak, som uppkommer genom underlåtenhet att följa de angivna instruktionerna.

FÖRSIKTIGHET: Detta kit innehåller material av animaliskt ursprung. Hantera reagenserna i kitet som om de är smittförande. Lämpliga försiktighetsåtgärder och god laborieresed måste följas vid lagring, hantering och bortskaffande av reagenserna i kitet. Bortskaffande av reagenserna i kitet ska ske enligt lokala bestämmelser.

Humana material

Humant material som använts vid beredningen av denna produkt har testats enligt FDA-rekommenderade analyser efter förekomst av antikroppar mot humant immunbristvirus (HIV I och II), hepatit B-ytantigen och antikroppar mot hepatit C och funnits vara negativt. Eftersom inget test kan helt garantera frånvaron av smittsamma ämnen ska reagenserna hanteras enligt biologisk säkerhetsnivå 2.

Reagenser som innehåller natriumazid

Vissa reagens i kitet innehåller natriumazid (NaN_3) < 0,1 % (w/w) som kan reagera med bly-, koppar- eller mässingsrör och bilda mycket explosiva metallazider. Vid bortskaffande, spola med stora volymer vatten för att förhindra ansamling av azid.

Klassificering enligt CLP:
EUH208

Faroangivelse:

EUH208 Innehåller en blandning av: 5-klor-2-metyl-2H-isotiazol-3-on [eg-nr 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [eg-nr 220-239-6]. Kan orsaka en allergisk reaktion.

Skyddsangivelse:

Ej tillämpligt

5. Hållbarhet och lagring av reagenser

Efter mottagandet ska Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-kitet förvaras vid 2–8 °C. Under dessa förhållanden är kitet stabilt fram till utgångsdatumet som anges på lådan.

Använd inte komponenterna i kitet efter utgångsdatum och blanda inte reagenser från olika loter.

Indikationer på möjlig försämring av kitets reagenser inkluderar:

- Närvaro av onormala partiklar i någon av reagenserna.
- En minskning av den maximala bindningen.
- En hög icke-specifik bindning.
- En ändring i kurvans lutning från dess normala position.

6. Provtagning och förvaring

- För optimala resultat rekommenderas att använda urin från andra morgontömningen. Stickprover av urin kan användas.
- I övervakningssyfte ska uppföljningsprover samlas in under samma förhållanden som baslinjeprovet.
- Före användning ska urinproverna skakas och sedan tillåtas att sedimentera i minst 30 minuter.
- Urinprovet kan förvaras vid 2–8 °C i högst 24 timmar. Förvara proverna vid -20 °C eller lägre för längre förvaring.
- Prover som är tydligt förorenade med helblod kan störa analysens prestanda. Sådana prover bör kasseras. Ta ett nytt prov.

Observera:

- Prover som innehåller partiklar ska centrifugeras innan analysen utförs.
- Prover som uppvisar mikrobiell kontaminering bör inte analyseras med kitet.
- Innan analyser utförs, säkerställ att prover, kalibratorer och kontroller är vid rumstemperatur (18–22 °C).
- Varje laboratorium ska följa riktlinjerna eller kraven i lokala, statliga och/eller federala bestämmelser eller enligt ackrediteringsorganisationer för att fastställa sin egen provhantering och provens lagringsstabilitet. För vägledning om lämpliga förfaranden, se CLSI GP44-A4, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests".

7. Material

Levererat material

MICROPLAT	Streptavidinbelagd mikrotiterplatta Mikrobrunn-remsor (12x8 brunnar) förbelagda med streptavidin. Levereras i en plastram.
CAL0	Kalibrator Bruksfärdig buffrad lösning innehållande proteinstabilisator, tvättmedel och konserveringsmedel; 1 flaska, 3,0 mL
CAL 1 -5	Kalibratörer Bruksfärdig buffrad lösning innehållande en syntetisk peptid med proteinstabilisatorer, tvättmedel och konserveringsmedel; 1 vardera av 5 koncentrationnivåer, 0,4 mL per flaska Det exakta värdet för varje standard anges i QC-rapporten.
CTRL 1 – 2	Kontroller Bruksfärdig buffrad lösning innehållande en syntetisk peptid med proteinstabilisatorer, tvättmedel och konserveringsmedel; 1 vardera av 2 koncentrationnivåer, 0,4 mL per flaska De etablerade intervallen för kontrollerna anges i QC-rapporten.
Ag BIOTIN	Biotinylerat antigen Biotinylerad syntetisk peptid beredd i en buffrad lösning innehållande proteinstabilisator, tvättmedel och konserveringsmedel; 1 flaska, 12,0 mL
Ab	Primär antikropp Bruksfärdig buffrad lösning innehållande monoklonal antikropp med proteinstabilisator, tvättmedel, konserveringsmedel och rött färgämne; 1 flaska, 12,0 mL
ENZYMCONJ	Peroxidas-konjugerad antikropp Bruksfärdiga peroxidaskonjugerade anti-mus-immunglobuliner (kanin) i en buffrad lösning med proteinstabilisator, tvättmedel, konserveringsmedel och blått färgämne; 1 flaska, 12,0 mL.
SUBS TMB	Substratlösning Bruksfärdigt tetrametylbenzidin (TMB)-substrat i en syrabuffert; 1 flaska, 12,0 mL Notera att det kromogena substratet kan verka något blåaktigt.
H₂SO₄	Stoppplösning Bruksfärdig lösning av 0,18 mol/L svavelsyra; 1 flaska, 12,0 mL
WASHBUF 50x	Tvättbuffert Koncentrerad tvättbuffert med rengöringsmedel och konserveringsmedel; 1 flaska, 20,0 mL

Självhäftande plattförslutning Självhäftande film för att täcka brunnar under inkubation.

Dokumentation Bruksanvisning och QC-rapport.

Material som krävs men inte ingår

- Behållare för att förbereda tvättlösningen
- Precisionspipetter som kan leverera 40 µL
- Destillerat vatten
- Precisionspipett med 8 eller 12 kanaler för att leverera 100 µL till 300 µL
- Virvelblandare
- Automatisk tvätt av mikroplatta (valfri)
- Fotometrisk läsare för mikroplatta och utrustning för dataanalys

8. Beredning av reagenser

Låt alla reagenser stå vid rumstemperatur (18–22 °C) i minst 60 minuter före användning. Blanda inte ihop komponenter från olika partier.

Beredning av tvättbuffert

Förbered genom att tillsätta 1 del tvättkoncentrat **WASHBUF 50x** till 50 delar destillerat vatten.

Alla andra reagenser levereras användningsklara.

Anmärkning: för att undvika potentiell mikrobiell och/eller kemisk kontamination får oanvända reagenser aldrig hållas tillbaka i de ursprungliga flaskorna.

9. Analysförfarande

Bered reagenserna enligt beskrivningen i § 8. Beredning av reagenser. Blanda alla reagenser och prover före användning (undvik skumbildning).

Observera: För att säkerställa överensstämmande resultat mellan körningar och operatörer samt minimera alla driftseffekter, följ strikt följande förfarande:

- a. Säkerställ att alla reagenser är vid rumstemperatur (18–22 °C) före användning – detta tar cirka 60 minuter.
- b. Förslut plattan under inkubation med plattförseglingarna som levereras med kiten.
- c. Träva inte plattorna under inkubation för att säkerställa en jämn temperatur i alla plattor.
- d. Se till att analysbrunnarna är varken under- eller överfyllda under tvättstegen.
- e. Tillsätt reagenser i samma sekvens varje gång för att minska risken för tidsavvikelse mellan reaktionerna.

Pipettera inte direkt från flaskan som innehåller TMB-substrat. Den volym som behövs bör först överföras till en ren behållare. Lösning som finns kvar i behållaren ska kasseras efter användning och INTE returneras till lagerflaskan **SUBS TMB**

Bestäm antalet remsor som behövs för analysen; det rekommenderas att alla prover testas i två exemplar. Dessutom behövs för varje körning totalt 16 brunnar för standarder och kontroller. Placera ett lämpligt antal remsor i plastramen. Förvara eventuellt oanvända remsor i den tätt slutna foliepåsen med kapslar med torkmedel.

1. Tillsätt 100 µL biotinylerat antigen **Ag BIOTIN** till varje brunn, täck med förseglingstejp och inkubera i 30 ± 5 minuter vid rumstemperatur, (18–22 °C) utan skakning.
 2. Tvätta alla brunnar 5 gånger med tvättbuffert

Automatisk plattvätt	Ställ in plattvättaren på att dispensera 300 µL tvättlösning per brunn Fyll och aspirera under 5 cykler
Manuell tvätt	Dekantera innehållet i brunnarna genom att snabbt vända plattan upp och ner Pipettera 300 µL tvättlösning i varje brunn, dekantera och upprepa 5 gånger Avlägsna överskott av tvättbuffert genom att knacka på absorberande duk innan du fortsätter

Se till att brunnarna är helt tömda efter varje manuell eller automatisk tvättcykel.
Fortsätt omedelbart till nästa steg vid slutet av tvättningen.
 3. Pipettera 40 µL kalibratorer **CAL 0 – 5**, kontroller **CTRL 1 - 2** eller okända prover i lämpliga brunnar följt av 100 µL antikropps lösning **Ab**.
 4. Täck immunoremsorna med förseglingstejp och inkubera i 21 ± 3 timmar vid 2–8 °C, utan skakning.
 5. Tvätta alla brunnar enligt steg 2
 6. Tillsätt 100 µL peroxidaskonjugerad antikropp **ENZYMCONJ** till varje brunn.
 7. Täck immunoremsorna med förseglingstejp och inkubera i 60 ± 5 minuter vid rumstemperatur (18–22 °C), utan skakning.
 8. Tvätta alla brunnar enligt steg 2
 9. Pipettera 100 µL av substratlösningen **SUBS TMB** i varje brunn och inkubera mörkt i 15 ± 2 minuter vid rumstemperatur (18–22 °C). Använd förseglingstejp.
- Observera:** pipettera inte direkt från flaskan som innehåller TMB-substrat. Den volym som behövs bör först överföras till en ren behållare. Lösning som finns kvar i behållaren ska kasseras efter användning och INTE returneras till lagerflaskan **SUBS TMB**
10. Pipettera 100 µL stopplösning **H₂SO₄** i varje brunn.
 11. Mät absorbansen vid 450 nm med 650 nm som referens inom två timmar.

Anmärkning: avläsare för mikroplattor mäter vertikalt; vidrör inte brunnarnas botten vid pipettering

Automatiserade plattformar

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA-kitet utformades och utvecklades för att utföras manuellt med hjälp av protokollet som beskrivs ovan. Protokollet är inte nödvändigtvis tillämpligt på automatiserade plattformar.

Om automatiserade plattformar används är det användarens ansvar att se till att kiten har testats på lämpligt sätt. För att förbättra kitens prestanda på automatiserade plattformar rekommenderas att öka antalet tvättcykler vid varje tvättsteg.

10. Beräkning av resultat

Olika typer av programvara för datasammanställning som kan användas för att generera medelkalibreringskurvan och beräkna medelkoncentrationerna för okända prover och kontroller finns tillgängliga. En logistisk kurvanpassning med 4 parametrar bör användas.

Om absorbansen för ett förspätt prov är över **kalibrator 5**, ska provet spädas med **kalibrator 0** och analyseras igen.

För varje urinprov bör koncentrationen av Urine CTX-II EIA CrossLaps ($\mu\text{g/L}$) och kreatinin ($\text{mM} = \text{mmol/L}$) fastställas med hjälp av en enzymatisk kolorimetrisk metod för klinisk kemianalysator.

Följande ekvation korrigerar CTX-II-koncentrationen för variation i urinkoncentrationen:

$$\text{Korrigerat CTX-II-värde (ng/mmol)} = [1\ 000 \times \text{CTX-II (}\mu\text{g/L)}] + \text{kreatinin (mmol/L)}$$

11. Kvalitetskontroll

God laboratorised (GLP) kräver användning av kvalitetskontrollprover i varje serie av analyser för att kontrollera analysens prestanda. Kontrollerna bör behandlas som okända prover och resultaten ska analyseras med lämpliga statistiska metoder.

De två kitkontrollerna som tillhandahålls i kitet är avsedda att hjälpa till att bedöma giltigheten för erhållna resultat med varje analysplatta.

IDS rekommenderar att användare upprätthåller grafiska register över kontrollvärden som genereras under varje analyskörning, inklusive körningsmediet, SD och %CV. Denna information underlättar kontrolltrendanalysen som förknippas med prestandan hos nuvarande och historiska kontrollpartier i förhållande till levererade data för kvalitetskontroll. Trenden hjälper till vid identifieringen av analyser som ger kontrollvärden som skiljer sig signifikant från deras medelintervall.

Vid tolkning av kontrolldata bör användare observera att denna produkt har utformats och utvecklats som en manuell produkt. Det fastställda intervallet i QC-certifikatet ska vara lämpligt för analyser som utförs manuellt och genom att strikt följa analysförfarandet som beskrivs ovan. Det är känt bland yrkesverksamma inom kvalitetskontroll att det alltid finns avvikelser i medelvärdena och precisionen för kontrollmätningar mellan olika laboratorier¹⁸, eftersom resultat skiljer sig beroende på betingelser och praxis.

12. Mätintervall

Detektionsgräns 0,20 $\mu\text{g/L}$

Detektionsgränsen fastställdes till 0,20 $\mu\text{g/L}$, vilket är den koncentration som motsvarar tre standardavvikelser under medelvärdet av 21 bestämningar av absorbansen av Urine CartiLaps Standard 0.

13. Användningsbegränsningar

- Liksom med alla diagnostiska förfaranden måste resultat tolkas tillsammans med patientens kliniska presentation och annan information som är tillgänglig för läkaren.
- Prestandakarakteristiken för denna analys har inte fastställts i en pediatrik population.
- Heterofila antikroppar i humant serum kan reagera med reagensimmunglobuliner och störa *in vitro*-immunanalyser¹⁹. Patienter som rutinmässigt exponeras för djur eller djurserumprodukter kan ha mer fallenhet för denna störning och avvikande värden kan observeras.
- Följande ämnen stör inte Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA när de koncentrationer som presenteras i följande tabell ligger under det angivna tröskelvärdet.

Potentiellt störande medel	Tröskelvärdet för koncentration
Urea	30 g/L
Kreatinin	10 mg/L
Glukos	5 mg/L
Ascorbinsyra	5 mg/L
Albumin	50 mg/L
Ibuprofen	50 g/L
Acetylsalicylsyra	50 g/L
Paracetamol	50 g/L

14. Förväntade värden

Varje laboratorium bör fastställa sina egna intervall för friska och patologiska CTX-II-värden. Som exempel anges de geometriska medelvärdena och 95 % konfidensintervall (CI) för olika populationer nedan. För ytterligare information, läs referenslistan i slutet av dessa instruktioner.

Befolkning	Antal försökspersoner	Ålder (år)	Medelvärde CTX-II (ng/mmol)	95 % CI (ng/mmol)
Alla kvinnor	459	20–85	299	79–1 137
Premenopausala	38	20–30	464	103–2 086
	165	30–59	200	65–618
Postmenopausala	28	48–53	164	66–410
	38	48–53	318	89–1 132
Alla manliga	256	46–85	363	112–1 172
	247	22–87	278	87–895
Man	27	20–30	501	214–1 171
	141	30–60	236	89–628
	79	> 60	305	85–1 096

Ovanstående intervaller bör endast betraktas som riktlinjer. Vi rekommenderar att varje laboratorium fastställer sitt eget förväntade intervall baserat på den egna patientpopulationen.

15. Prestandauppgifter

Representativa prestandauppgifter visas. Resultaten som erhålls vid enskilda laboratorier kan variera.

15.1 Noggrannhet

Precisionen bestämdes med hjälp av tio analytiska körningar, var och en med dubbla bestämmningar av urinprover.

Prov	Medelkoncentration (µg/L)	Inom-analys		Mellan analyser	
		SD (µg/L)	CV %	SD (µg/L)	CV %
Låg	0,52	0,04	7,8	0,06	12,2
Medium	1,84	0,08	4,6	0,20	10,8
Hög	5,50	0,28	5,2	0,38	6,9

15.2 Spädning/linjäritet

Spädningsutbytet av Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA fastställdes som 96 %. Fyra urinprover späddes ut med Urine CartiLaps Standard 0. Koncentrationen av CTX-II fastställdes i Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA och utbytet beräknades efter korrigering med spädningsfaktorn.

Spädningsfaktor	Utbyte (%)				Medelvärde
	1	2	3	4	
1 x	100	100	100	100	96
2 x	92	104	92	98	
4 x	88	105	86	93	
8 x	84	104	89	108	

15.3 Specificitet

Den epitop som detekteras i Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA är mycket bevarad och därför kan testet tillämpas på urinprov från många andra arter, inklusive icke-mänskliga primater, nötkreatur, hästar, grisar, kaniner, råttor och möss.

16. Använda symboler



Katalognummer



In vitro-diagnostisk anordning



Tillverkare



Används i enlighet med direktiv 98/79/EG

Rx Only

Varning: Enligt amerikansk lag får denna produkt endast säljas av eller på ordination av (legitimerad vårdpersonal). (Endast för USA)



EU Importör

17. REFERENSER

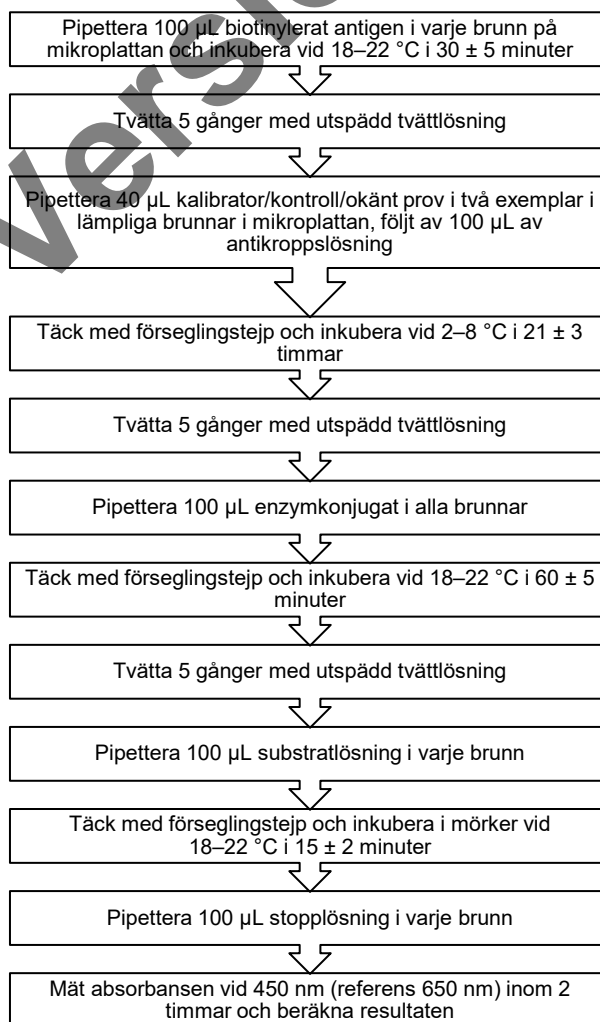
1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2004); 6: R457-68.
6. Garnero P. et al., Association of 10 molecular markers of bone, cartilage and synovium with disease activity and joint damage in hip osteoarthritis patients: the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
8. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
9. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
10. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
11. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
12. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
13. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
14. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
15. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
16. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
17. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.
18. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
19. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited
 10 Didcot Way, Boldon Business Park
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com
 IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany



Analysförfarande





Název produktu	Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA	REF	AC-10F1
Zkrácený název produktu	Urine CTX-II EIA		

1. Určené použití

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA je enzymový imunologický test pro kvantifikaci produktů degradace C-terminálních telopeptidů kolagenu typu II v lidské moči. Výsledky se mají používat ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními daty pro zjištění degradace chrupavky a lze je použít jako pomůcku pro:

- kvantitativní zhodnocení aktivity onemocnění (strukturálního poškození kloubní chrupavky) u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a osteoartritidou (OA)
- prognózu aktivity onemocnění u pacientů s RA a OA
- časné zhodnocení dlouhodobého účinku léčby u pacientů s RA

2. Shrnutí a vysvětlení

Narušení strukturální integrity chrupavky je hlavním histologickým nálezem u osteoartritidy a revmatoidní artritidy. Kolagen typu II je hlavní organickou složkou chrupavky a po degradaci chrupavky se uvolňují fragmenty kolagenu typu II (CTX-II) do oběhu a následně se sekretují do moči. V moči lze fragmenty CTX-II kvantifikovat testem Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA.

Bylo hlášeno, že test Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA je užitečný při predikci progresu osteoartritidy¹⁻² a při jiných klinických a preklinických vyšetřováních³⁻⁹.

3. Popis metody

Test Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA je založený na kompetitivní vazbě monoklonální protilátky na fragmenty kolagenu typu II v moči⁴ nebo na biotinylované syntetické peptidy navázané na povrch mikrotitračních destiček potažených streptavidinem.

Nejprve se na povrch streptavidinem potažených jamek mikrotitrační destičky navážou biotinylované syntetické peptidy. Po promytí se do jamek napipetují kalibrátory, kontroly a vzorky moči a následně se přidá monoklonální protilátka. Jamky se promyjí a přidá se do nich roztok anti-myšího imunoglobulinu (králíčího) konjugovaného s peroxidázou. Po druhém promývacím kroku se jamky inkubují s chromogenním substrátem. Reakce se zastaví a změří se absorbance.

4. Upozornění a opatření

Test Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA je určený pouze pro diagnostické použití *in vitro* a není určený pro vnitřní použití u lidí ani zvířat. Tento výrobek musí být používán přísně v souladu s pokyny uvedenými v tomto návodu k použití. Společnost Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) neponese odpovědnost za žádné ztráty či škody (kromě odpovědnosti stanovené zákonem) způsobené jakýmkoli způsobem, k nimž došlo v důsledku nedodržení poskytnutých pokynů.

UPOZORNĚNÍ: Tato souprava obsahuje materiál živočišného původu. Zacházejte s reagensy z této soupravy jako s materiály potenciálně přenášejícími infekční choroby. Při skladování reagensů ze soupravy, manipulaci s nimi a jejich likvidaci musí být dodržována příslušná bezpečnostní opatření a zásady správné laboratorní praxe. Likvidace reagensů ze soupravy se musí provádět v souladu s místními předpisy.

Materiály lidského původu

Materiál lidského původu použitý při přípravě tohoto produktu byl testován pomocí stanovení schválených FDA na přítomnost protilátek proti viru lidské imunodeficiency (HIV I a II), povrchového antigenu hepatitidy B a protilátek proti viru hepatitidy C a bylo zjištěno, že je negativní. Protože žádný test neumožňuje dosáhnout úplné jistoty, že nejsou přítomny žádné infekční látky, s reagensy se má zacházet podle zásad úrovně biologické bezpečnosti 2.

Reagencie obsahující azid sodný

Některé reagencie v této soupravě obsahují azid sodný (NaN_3) < 0,1 % (w/w), který může reagovat s olovem, mědí nebo mosaznými armaturami za vzniku vysoce výbušných azidů kovů. Při likvidaci tyto materiály splachujte velkým množstvím vody, aby se zabránilo vzniku usazenin azidů.

Klasifikace podle CLP:

EUH208

Standardní věty o nebezpečnosti:

EUH208 Obsahuje směs: Methylchlorisothiazolinon [č. ec 247-500-7] a methylisothiazolinon [č. ec 220-239-6]. Může vyvolat alergickou reakci.

Pokyny pro bezpečné zacházení:

–

5. Doba použitelnosti a uchovávání reagensů

Soupravu Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA po přijetí skladujte při teplotě 2–8 °C. Za těchto podmínek je souprava stabilní až do data expirace uvedeného na krabici.

Nepoužívejte součásti soupravy po datu expirace a nesmíchejte reagensy z různých šarží.

Známky možného zhoršení kvality reagensů v soupravě mohou být:

- Přítomnost abnormálních částic ve kterékoli reagensii.
- Pokles schopnosti maximální vazby.
- Vysoká nespecifická vazba.
- Posun sklonu („slope“) křivky oproti normální pozici.

6. Odběr a uchovávání vzorků

- Pro optimální výsledky se doporučuje používat moč z druhého ranního močení. Lze použít jednorázový vzorek moči.
- Pro účely monitorování se doporučuje odebírat následné kontrolní vzorky za stejných podmínek jako výchozí vzorek.
- Před použitím je třeba vzorky moči protřepat a nechat je usadit po dobu minimálně 30 minut.
- Vzorek moči lze skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu maximálně 24 hodin. Při delším skladování skladujte vzorky při teplotě -20 °C nebo nižší.
- Vzorky, které jsou zjevně kontaminované plnou krví, mohou interferovat s funkcí testu. Takové vzorky musí být zlikvidovány a musí být odebrán nový vzorek.

Poznámka:

- Vzorky obsahující částice se musí před provedením stanovení odstředit.
- Vzorky vykazující mikrobiální kontaminaci by neměly být testovány pomocí této soupravy.
- Před provedením testů zajistěte, aby vzorky, kalibrátory a kontroly měly pokojovou teplotu (18–22 °C).
- Každá laboratoř se musí řídit pokyny nebo požadavky místních, státních a/nebo federálních předpisů či akreditačních organizací a stanovit vlastní pravidla ohledně stability při manipulaci se vzorky a skladování vzorků. Návod k příslušným postupům naleznete v dokumentu CLSI GP44-A4, „Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests“.

7. Materiály

Dodané materiály

MICROPLAT

Mikrotritační destička potažená streptavidinem

Stripy s mikrojamkami (12 × 8 jamek) potaženými streptavidinem. Dodávané v plastovém rámu.

CAL0

Kalibrátor

Pufrovaný roztok připravený k použití, s proteinovým stabilizátorem, detergentem a konzervační látkou; 1 lahvička, 3,0 mL.

CAL 1 -5

Kalibrátory

Pufrovaný roztok připravený k použití obsahující syntetický peptid s proteinovými stabilizátory, detergentem a konzervační látkou; 1 od každé z 5 hladin koncentrace, 0,4 mL v každé lahvičce. Přesná hodnota pro každý standard je vytištěna v certifikátu kontroly kvality (QC).

CTRL 1 - 2

Kontroly

Pufrovaný roztok připravený k použití obsahující syntetický peptid s proteinovými stabilizátory, detergentem a konzervační látkou; 1 od každé z 2 hladin koncentrace, 0,4 mL v každé lahvičce. Rozsahy stanovené pro kontroly jsou vytištěny v certifikátu kontroly kvality (QC).

Ag BIOTIN

Biotinylovaný antigen

Biotinylovaný syntetický peptid připravený v pufrovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem, detergentem a konzervační látkou; 1 lahvička, 12,0 mL.

Ab

Primární protilátka

Pufrovaný roztok připravený k použití obsahující monoklonální protilátku s proteinovým stabilizátorem, detergentem, konzervační látkou a červeným barvivem; 1 lahvička, 12,0 mL.

ENZYMCONJ

Protilátka konjugovaná s peroxidázou

Anti-myší imunoglobuliny (králíčí) konjugované s peroxidázou, připravené k použití, v pufrovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem, detergentem, konzervační látkou a modrým barvivem; 1 lahvička, 12,0 mL.

SUBS TMB

Roztok substrátu

Substrát tetramethylbenzidin (TMB) připravený k použití, v kyselém pufru; 1 lahvička, 12,0 mL. Vezměte prosím na vědomí, že chromogenní substrát může mít mírně namodralou barvu.

H₂SO₄

Zastavovací roztok

Roztok kyseliny sírové připravený k použití, 0,18 mol/L; 1 lahvička, 12,0 mL.

WASHBUF 50x

Promývací pufr

Konzentrovaný promývací pufr s detergentem a konzervační látkou; 1 lahvička, 20,0 mL.

Adhezivní fólie na destičky adhezivní fólie na přikrytí jamek během inkubace.

Dokumentace návod k použití a certifikát kontroly kvality (QC).

Potřebné materiály – nejsou součástí dodávky

- Nádoby na přípravu promývacího roztoku
- Přesná pipetovací zařízení pro objem 40 µL
- Destilovaná voda
- Přesné 8kanálové nebo 12kanálové multipipety pro objemy 100 µL až 300 µL
- Vortexová míchačka
- Automatická promývací stanice pro mikrotitrační destičky (volitelný doplněk)
- Čtečka mikrotitračních destiček na bázi fotometru a zařízení pro analýzu dat

8. Příprava reagensů

Před použitím nechte všechny reagensy vytemperovat na pokojovou teplotu (18–22 °C) po dobu nejméně 60 minut. Nezaměňujte součásti soupravy pocházející z různých šarží.

Příprava promývacího pufru

Připravuje se přidáním 1 dílu koncentrátu **WASHBUF 50x** k 50 dílům destilované vody.

Všechny ostatní reagensy se dodávají připravené k okamžitému použití.

Upozornění. Aby se zabránilo možné mikrobiální a/nebo chemické kontaminaci, nepotřebované reagensy by se nikdy neměly vracet do původních lahvíček.

9. Postup testování

Připravte reagensy podle popisu v bodě 8. Příprava reagensů. Před použitím promíchejte všechny reagensy a vzorky (zabraňte vytvoření pěny).

POZNÁMKA: Aby byly výsledky získané v různých cyklech analýz a různými laboranty porovnatelné a posuny byly co nejmenší, přesně dodržte následující postup:

- a. Před použitím vytemperujte všechny reagensy na pokojovou teplotu (18–22 °C) – bude to trvat přibližně 60 minut.
- b. Po dobu inkubace musí být destička potažena fólií na destičky, která je dodávána jako součást soupravy testu.
- c. Během inkubace destičky nastavte na sebe, aby bylo jisté, že teplota je pro všechny destičky stejná.
- d. Testovací jamky se při promývání nesmí přeplňovat ani plnit nedostatečně.
- e. Činidla vždy přidávejte ve stejném pořadí, aby se zmenšila časová odchylka mezi reakcemi.

Nepipetujte přímo z lahvičky obsahující substrát TMB. Požadovaný objem by měl být nejprve přenesen do čisté nádoby. Roztok, který zůstane v nádobce, musí být po použití zlikvidován a NESMÍ být vrácen do zásobníkové lahvičky **SUBS TMB**.

Určete počet stripů potřebných pro test; doporučuje se testovat všechny vzorky ve dvojnásobném provedení. Navíc je pro každý cyklus potřeba celkem 16 jamek pro standardy a kontroly. Umístěte příslušný počet stripů do plastového rámu. Nepoužité stripy uchovávejte v těsně uzavřeném fóliovém sáčku s vysoušecími tobolečkami.

1. Přidejte do každé jamky 100 µL biotinylovaného antigenu **Ag BIOTIN**, zakryjte je těsnicí fólií a inkubujte je po dobu 30 ± 5 minut při pokojové teplotě (18–22 °C) bez třepání.
 2. Všechny jamky 5krát promyjte promývacím pufrům

Automatické promývání destičky	Nastavte promývací stanici pro destičky tak, aby do každé jamky nadávkovala 300 µL promývacího roztoku Provedte 5 cyklů plnění a aspirace
Ruční promytí	Prudkým převrácením slijte obsah jamek. Napipetujte 300 µL promývacího roztoku do každé jamky, slijte a opakujte 5krát. Než budete pokračovat, odstraňte přebytečný promývací pufr energickým poklepáním o savý papír.

Po každém manuálním nebo automatickém promývacím cyklu musí být jamky zcela vyprázdněny.
Po dokončení promývání ihned přejděte k dalšímu kroku.
 3. Napipetujte 40 µL kalibrátorů **CAL 0 – 5**, kontrol **CTRL 1 – 2** nebo neznámých vzorků do správných jamek a následně do nich napipetujte 100 µL roztoku protilátky **Ab**.
 4. Zakryjte imunostripy těsnicí fólií a inkubujte je po dobu 21 ± 3 h při teplotě 2–8 °C bez třepání.
 5. Promyjte všechny jamky jako v kroku 2.
 6. Přidejte do každé jamky 100 µL protilátky konjugované s peroxidázou **ENZYMCONJ**.
 7. Zakryjte imunostripy těsnicí fólií a inkubujte je po dobu 60 ± 5 minut při pokojové teplotě (18–22 °C) bez třepání.
 8. Promyjte všechny jamky jako v kroku 2.
 9. Napipetujte do každé jamky 100 µL roztoku substrátu **SUBS TMB** a inkubujte je po dobu 15 ± 2 minut při pokojové teplotě (18–22 °C) v temnu. Použijte těsnicí fólii.
- POZNÁMKA:** Nepipetujte přímo z lahvičky obsahující substrát TMB. Požadovaný objem by měl být nejprve přenesen do čisté nádoby. Roztok, který zůstane v nádobce, musí být po použití zlikvidován a NESMÍ být vrácen do zásobníkové lahvičky **SUBS TMB**.
10. Napipetujte do každé jamky 100 µL zastavovacího roztoku **H₂SO₄**.
 11. Do dvou hodin změřte absorbanci při 450 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm.

Upozornění. Čtečky mikrodestiček měří ve svislém směru; při pipetování se nedotýkejte dna jamek.

Automatizované platformy

Souprava Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA byla navržena a vyvinuta na manuální provedení podle výše popsaného protokolu. Protokol nemusí být vždy použitelný pro automatizované platformy.

Pokud jsou používány automatizované platformy, je odpovědností uživatele zajistit, aby souprava byla náležitě testována. Pro zlepšení výkonu soupravy na automatizovaných platformách se doporučuje zvýšit počet promývacích cyklů v každém kroku promývání.

10. Výpočet výsledků

K dispozici jsou různé softwarové balíčky pro redukci dat, které lze použít k vytvoření průměrné kalibrační křivky a pro výpočty průměrných koncentrací analytu v neznámých vzorcích a kontrolách. Je nutné použít 4parametrovou logistickou křivku.

Pokud absorbance předředěného vzorku přesahuje **kalibrátor 5**, je nutné zředit vzorek **kalibrátorem 0** a analyzovat ho znovu.

Pro každý vzorek moči je potřeba stanovit koncentraci Urine CTX-II EIA CrossLaps ($\mu\text{g/L}$) a koncentraci kreatininu ($\text{mM} = \text{mmol/L}$) pomocí enzymatické kolorimetrické metody pro klinický chemický analyzátor.

Následující rovnice koriguje koncentraci CTX-II na odchylky koncentrace v moči:

$$\text{Korigovaná hodnota CTX-II (ng/mmol)} = [1\,000 \times \text{CTX-II } (\mu\text{g/L})] \div \text{kreatinin (mmol/L)}$$

11. Kontrola kvality

Správná laboratorní praxe (SLP) vyžaduje použití vzorků kontroly kvality v každé sérii testů, což umožňuje zkontrolovat provedení testu. S kontrolami by se mělo zacházet stejně jako s neznámými vzorky a výsledky by měly být analyzovány pomocí vhodných statistických metod.

Dvě kontroly dodané v soupravě slouží jako pomoc při posuzování platnosti výsledků získaných pro jednotlivé testované destičky.

Společnost IDS doporučuje uživatelům, aby vedli grafické záznamy hodnot kontrol stanovených v každém testovacím cyklu, včetně klouzavých průměrů, směrodatných odchylek (SD) a procentuálních variačních koeficientů (% CV). Tyto informace usnadní analýzu trendů kontrol v testech aktuálních a historických šarží kontrol ve vztahu k poskytnutým údajům o kontrole kvality. Zjišťování trendů slouží jako pomůcka při identifikaci testů, v nichž jsou hodnoty kontrol významně odlišné od průměrného rozsahu.

Při interpretaci údajů o kontrolách by uživatelé měli mít na paměti, že tento výrobek byl navržen a vyvíjen pro ruční stanovení. Rozsah uvedený na certifikátu kontroly kvality (QC) by měl být správný pro testy, které jsou prováděny ručně a za přesného dodržení postupu testu, který je popsán výše. Odborníci na kontrolu kvality vědí, že v důsledku rozdílných podmínek a postupů budou průměrné hodnoty a preciznost kontrolních měření provedených různými laboratořemi vždy odlišné¹⁸.

12. Rozsah měření

Detekční limit 0,20 $\mu\text{g/L}$

Hodnota detekčního limitu byla stanovena na 0,20 $\mu\text{g/L}$, což je koncentrace odpovídající třem směrodatným odchylkám pod průměrem 21 stanovení absorbance standardu 0 Urine CartiLaps.

13. Omezení použití

- Stejně jako v případě jakýchkoli jiných diagnostických postupů musí být výsledky interpretovány společně s klinickým obrazem pacienta a jinými informacemi, které má lékař k dispozici.
- Charakteristiky tohoto stanovení v pediatrické populaci nebyly zjištěny.
- Heterofilní protilátky v lidském séru mohou reagovat s imunoglobuliny reagentů a interferovat s imunologickými stanoveními *in vitro*¹⁹. Pacienti, kteří se běžně setkávají se zvířaty nebo s výrobky z živočišných sér, mohou být k této interferenci náchylní a mohou u nich být zjištěny anomální hodnoty.
- Následující látky neinterferují s testem Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA, pokud jsou jejich koncentrace nižší než prahové hodnoty uvedené v následující tabulce.

Potenciálně interferující látka	Prahová koncentrace
Močovina	30 g/L
Kreatinin	10 mg/L
Glukóza	5 mg/L
Kyselina askorbová	5 mg/L
Albumin	50 mg/L
Ibuprofen	50 g/L
Kyselina acetylsalicylová	50 g/L
Paracetamol	50 g/L

14. Očekávané hodnoty

Je vhodné, aby si každá laboratoř stanovila vlastní rozmezí zdravých a patologických hodnot CTX-II. Níže jsou uvedeny příklady hodnot geometrických průměrů a 95% intervalů spolehlivosti (IS) pro různé populace. Více informací naleznete v seznamu literatury na konci těchto pokynů.

Populace	Počet subjektů	Věk (roky)	Průměrná hodnota CTX-II (ng/mmoL)	95 % IS (ng/mmoL)
Všechny ženy	459	20–85	299	79–1 137
Před menopauzou	38	20–30	464	103–2 086
	165	30–59	200	65–618
Po menopauze	28	48–53	164	66–410
	38	48–53	318	89–1 132
Všichni muži	256	46–85	363	112–1 172
	247	22–87	278	87–895
Muži	27	20–30	501	214–1 171
	141	30–60	236	89–628
	79	> 60	305	85–1 096

Výše zmíněná rozmezí je nutno považovat pouze za doporučené hodnoty; doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní rozmezí očekávaných hodnot na základě vlastní populace pacientů.

15. Charakteristiky

Zde jsou uvedeny reprezentativní charakteristiky. Výsledky získané v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

15.1 Preciznost

Preciznost byla stanovena pomocí deseti analytických cyklů, z nichž každý představoval stanovení vzorků moči v duplikátech.

Vzorek	Průměrná konc. (µg/L)	V rámci testu		Mezi testy	
		SD (µg/L)	CV%	SD (µg/L)	CV%
Nízký	0,52	0,04	7,8	0,06	12,2
Střední	1,84	0,08	4,6	0,20	10,8
Vysoký	5,50	0,28	5,2	0,38	6,9

15.2 Ředění/linearita

Výtěžnost testu Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA při ředění byla stanovena na 96 %. Čtyři vzorky moči byly zředěny standardem 0 Urine CartiLaps. Koncentrace CTX-II byla stanovena testem Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA a po korekci pomocí ředícího faktoru byla vypočtena výtěžnost.

Ředící faktor	Výtěžnost (%)				Průměrná hodnota
	1	2	3	4	
1×	100	100	100	100	96
2×	92	104	92	98	
4×	88	105	86	93	
8×	84	104	89	108	

15.3 Specifická

Epitop detekovaný testem Urine CartiLaps® (CTX-II) EIA je vysoce konzervovaný, takže lze test použít na vzorky moči mnoha různých druhů, včetně primátů jiných než jsou lidé, skot, koně, prasata, králíci, potkani a myši.

16. Použité symboly



Katalogové číslo



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



Výrobce



Aplikováno v souladu se směrnicí 98/79/ES

Rx Only

Federální zákony omezují prodej tohoto prostředku na licencované praktické lékaře nebo na jejich objednávku (Pouze v USA)



EU Dovoze

17. LITERATURA

1. Ceunick F De. et al., Urinary collagen type II C-telopeptide fragments are sensitive markers of matrix metallo-proteinase dependent cartilage degradation in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheumatol* (2003); 30: 1561-1564.
2. Christgau S. et al., Suppression of Elevated Cartilage Turnover in Postmenopausal Women and in Ovariectomized Rats by Estrogen and a Selective Estrogen-Receptor Modulator (SERM). *Menopause* (2004); 11: 508-518.
3. Christgau S. et al., Cartilage Degradation In Glucosamine Sulphate Treated Knee Osteoarthritis Patients With Elevated Levels Of Urinary Collagen Type II C-Telopeptide Fragments. *Clin Exp Rheumatol.* (2004) 22(1):36-42.
4. Christgau S. et al., Collagen type II degradation products in urine as an index of cartilage degradation. *Bone* (2001); 29: 209-215.
5. Forsblad d'Elia H. et al., Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA Study. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2847-2856.
6. Garnero P. et al., Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46:2613-2624.
7. Garnero P. et al., Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum* (2002); 46: 21-30.
8. Garnero P. et al., The bisphosphonate Zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* (2001); 28: 461-464.
9. Garnero P. et al., Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* (2001); 60: 619-26.
10. Høegh-Andersen P. et al., Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Osteoarthritis. Validation and Application. *Annals of Rheum Dis.* (2004); 6(2): R169-80.
11. Jung M. et al., Elevated urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology.* (2004); 71(2): 70-6
12. Lehmann HJ. et al., The effects of bisphosphonates on CartiLaps: A new marker for cartilage degradation. *Ann Rheum Dis* (2002); 61:530-533.
13. Mazières B. et al., Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis are strong independent predictors of structural progression of hip osteoarthritis (OA). the ECHODIAH cohort. *ACR* 2003.
14. Mouritzen U. et al., CartiLaps: A novel marker of Cartilage Degradation. The influence of age, gender, menopause, hormone replacement therapy and bone mass index. *Annals Rheum Dis.* (2003); 62: 332-336.
15. Roy-Beaudry M. et al., Entothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via mmp-1 and mmp-13 induction. *Arthritis & Rheum* (2003); 48:2855-2864.

16. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
17. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33



Immunodiagnostic Systems Limited

10 Didcot Way, Boldon Business Park
Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
Tel.: +44 191 519 0660
Fax: +44 191 519 0760

e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
Herriotstrasse 1
60528 Frankfurt am Main
Germany

Postup testování

