

TSEKKI/ČESKY

UniQ®

# ICTP<sub>RIA</sub>

**C-terminální telopeptid kolagenu typu I  
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky  
s navázanou protilátkou  
Kat.č. 68601**

## **Návod k použití soupravy**

**Září 2013**

Určený účel použití	3
Klinický význam ICTP	3
Princip testu	4
Reagencie	5
Přístroje	7
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	7
Pracovní postup	8
Omezení metody	9
Zajištění jakosti	9
Výpočet výsledků	10
Referenční intervaly	11
Analytické parametry měření	12
Literatura (viz originální příbalová informace)	









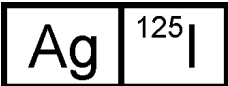






  
DIAGNOSTICA

*Výrobce:*

Orion Diagnostica Oy  
Koivu-Mankkaan tie 6 B  
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland  
Tel. +358-10-4261, Fax +358-10-426 2794  
www.oriondiagnostica.com

**CE**

## Vysvětlení použitých symbolů

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Použitelné do
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Vhodné pro
	Viz návod k použití
	Radioindikátor
	Protilátka proti ICTP
	Kontrolu
	Koncentrace kalibrátoru
	Původ: lidský
	Obsahuje azid sodný
 Xn	Škodlivé

## **URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ**

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

## **KLINICKÝ VÝZNAM ICTP**

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

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

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

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

## **PRINCIP TESTU**

UniQ ICTP RIA test je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy. Znamé množství značeného ICTP a neznámé množství neznačeného antigenu soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky. Po separaci volného antigenu je množství značeného ICTP ve zkumavce nepřímo úměrné množství ICTP ve vzorku. Koncentrace v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

## REAGENCIE

### Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
<b>ICTP RIA TRACER:</b> RADIOINDIKÁTOR ICTP RIA: Připraven k použití. Radioindikátorem je [ <sup>125</sup> I]- značený ICTP v PBS tlumivém roztoku. NaN <sub>3</sub> a červené barvivo	1 lahvička, 22 ml  Radioaktivita <200kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP RIA ANTISERUM:</b> ANTISÉRUM ICTP RIA: Připraveno k použití. Králičí antisérum v PBS tlumivém roztoku. NaN <sub>3</sub> a modré barvivo.	1 lahvička 22 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP RIA CALIBRATORS:</b> KALIBRÁTORY ICTP RIA: Připraveny k použití. Koncentrace ICTP 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10; 25 a 50 µg/l v PBS tlumivém roztoku. NaN <sub>3</sub> . <i>Kalibrováno proti interní master kalibrační soupravě.</i>	7 lahviček 0,75 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
<b>ICTP RIA CONTROLS 1 &amp; 2:</b> ICTP RIA KONTROLY 1& 2: Lyofilizované lidské sérum. NaN <sub>3</sub> . Očekávané hodnoty jsou uvedeny na zvláštním listě.	2 lahvičky  Rekonstituovat 1ml destilované vody	Při teplotě 2 – 8°C 1 týden po rekonstituci. Delší skladování při teplotě -20°C . Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.
<b>ICTP RIA SEPARATION REAGENT:</b> ICTP RIA SEPARAČNÍ REAGENCIE: Připravena k použití. Separační reagent je polyetylglykol (PEG) v PBS tlumivém roztoku obsahující kozí gamaglobulin proti králičím protilátkám. NaN <sub>3</sub> .	1 lahvička  60 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.

Reagencie obsahují NaN<sub>3</sub> jako konzervační činidlo, čtěte laskavě „Upozornění a varování“.

## Upozornění a varování

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

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

Materiály použité k čištění by měly být likvidovány dle předpisů.

**VAROVÁNÍ 2:** Souprava obsahuje  $^{125}\text{I}$  (poločas rozpadu  $T_{1/2}$  60 dní) emitující 35,5 keV gama záření a 27 - 32 keV rentgenového záření.

**Radioaktivní materiál** mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracoviště, která splňují ustanovení zákona 18/1997 Sb. v platném znění a příslušných vyhlášek Ministerstva zdravotnictví.

Při práci s radioaktivním materiálem dodržujte následující pravidla:

- všechny radioaktivní materiály skladujte v původním balení a jen na místech k tomu určených, s radioaktivním materiálem pracujte pouze ve schválených prostorách
- příjem a spotřebu radioaktivních látek evidujte
- povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, pravidelně kontrolujte
- ukápnutý radioaktivní materiál je nutno okamžitě utřít a kontaminované čisticí materiály umístit do sběrné nádoby pro radioaktivní odpad, potřísněné povrchy vyčistěte příslušným dekontaminantem (čištění je možno usnadnit překrytím pracovní plochy jednorázovým absorpčním materiálem)
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami, musí být před dalším použitím řádně dekontaminováno a proměřeno
- radioaktivní materiál, určený do odpadu musí být likvidován v souladu s platnými právními předpisy v daném státě

**VAROVÁNÍ 3:** Se všemi vzorky pacientů je nutno pracovat jako s **potenciálně infekčním** materiálem. Výchozím materiálem pro kalibrátory je lidská krev, která byla testována licencovanými reagencemi a shledána negativní na HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátky. Vzhledem k tomu, že žádný známý test nemůže dát jistotu, že

materiál není infekční, pracujte s ním jako s materiálem potenciálně infekčním.

**VAROVÁNÍ 4:** Reagencie obsahují **azid sodný ( $\text{NaN}_3$ )** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azid sodný, který je v této koncentraci škodlivý při vdechnutí, polknutí a při kontaktu s kůží. Proloužením expozice se zvyšuje nebezpečí vážného poškození zdraví. Po rekonstituci obsahují kalibrátory < 0,1% azidu sodného, což se za škodlivou koncentraci nepovažuje.

Azid sodný může reagovat s olověnými nebo měděnými uzávěry za tvorby vysoce explozivních azidů příslušných kovů. Jako prevenci tvorby azidů opláchněte uzávěry před likvidací velkým množstvím vody. Výjimečně mohou být kovové uzávěry opláchnuty také 10% hydroxidem sodným. Při kontaktu s kyselinami tvoří  $\text{NaN}_3$  toxické výpary.

## **PŘÍSTROJE**

K měření lze použít jakýkoliv gama čítač schopný měření  $^{125}\text{I}$ . Účinnost měření by měla být pravidelně kontrolována, stejně tak i proměřováno pozadí. Doporučuje se systematická kalibrace přístroje. Podrobnosti týkající se zapojení, použití, údržby a kalibrace najdete v návodu k obsluze dodávaném výrobcem přístroje.

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

Používejte sérum, asepticky odeberte venózní krev za dodržení běžných bezpečnostních opatření.

Vzorky sér se mohou skladovat až 5 dnů při teplotě 2...8°C. Pro dlouhodobější skladování se doporučuje teplota nejméně -20°C. Je třeba vyhnout se opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku.

Vzorky s vysokou koncentrací ICTP lze ředit pomocí 0,9 % NaCl.

## PRACOVNÍ POSTUP

### Potřebný materiál, který není součástí soupravy:

MIKROPIPETY pro přesné dávkování 100 µl, 200 µl, 500 µl a 1000 µl

TESTOVACÍ ZKUMAVKY (z polystyrenu)

BUNIČITÁ VATA

KRYCÍ FOLIE PARAFILM

VIBRAČNÍ MÍCHADLO

VODNÍ LÁZEŇ s teplotou 37°C

DEKANTOVACÍ STOJÁNEK

CENTRIFUGA s odstředivou silou nejméně 2000 g

GAMA-ČÍTAČ

DESTILOVANÁ VODA

### Rekonstituce kontrol

Všechny lahvičky s reagensiemi před otevřením vytemperujte na pokojovou teplotu (18 - 25°C). Kontroly rekonstituujte přídatkem 1,0 ml destilované vody do každé lahvičky. Zavřete víčko a důkladně promíchejte jemným kroužením nebo převrácením, zamezte přitom tvorbě pěny. Před použitím nechte stát 30 minut.

### Pracovní postup

1. Všechny reagensie a vzorky **temperujte** na laboratorní teplotu (18 – 25 °C) alespoň 30 minut před použitím.
2. **Označte** sadu zkumavek v duplikátech pro nescifickou vazbu (NSB), kalibrátory, kontroly, vzorky sér pacientů a pro celkovou aktivitu.
3. Do odpovídajících zkumavek **napipetujte** po 100 µl kalibrátorů, kontrolních vzorků a vzorků sér pacientů. Do zkumavek pro stanovení nescifické vazby (NSB) lze pipetovat sérum kteréhokoliv pacienta.
4. Do všech zkumavek **přidejte** 200 µl radioindikátoru (červený).
5. Do všech zkumavek, kromě NSB a celkové aktivity, **napipetujte** 200 µl roztoku protilátky (modrý). Do zkumavek určených pro stanovení NSB přidejte 200 µl destilované vody.
6. Obsah všech zkumavek důkladně **promíchejte** na vibračním míchadle, zkumavky překryjte fólií a **inkubujte** 2 hodiny při 37°C.
7. Separační činidlo nejprve důkladně **promíchejte** šetrným převrácením lahvičky dnem vzhůru a **přidejte** po 500 µl do všech zkumavek kromě zkumavek s celkovou aktivitou.
8. Obsah zkumavek důkladně **promíchejte** na vibračním míchadle a **inkubujte** 30 minut při pokojové teplotě.



9. Zkumavky **centrifugujte** 30 minut při nejméně 2000 g při teplotě v rozmezí 4 - 20°C (doporučovaná teplota je 4°C).
10. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **dekatujte**. Jemně klepněte zkumavkami do buničité vaty a ponechte několik vteřin odkapat, aby se odstranil i poslední zbytek kapaliny. Dejte pozor, aby nedošlo k dekantaci sraženiny. **Zkumavky jednou otočené nazpět již znovu dnem vzhůru neotáčejte**. Pokud ve zkumavkách zůstanou zbytky kapaliny, způsobí to rozptýl v hodnotách replikátů a chybné hodnoty.
11. **Změřte** radioaktivitu všech zkumavek pomocí gamma-čítače po dobu alespoň 1 minuty nebo po akumulaci 10 000 impulsů/zkumavku.

## OMEZENÍ METODY

ICTP hodnoty podléhají diurnálnímu kolísání s vyššími hodnotami v noci. Při nedostatečnosti ledvin, je-li rychlost glomerulární filtrace 50 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a nižší, dochází ke zvýšení koncentrací ICTP v krvi. Zdá se, že játra se metabolismu sérového antigenu ICTP neúčastní.

ICTP by nemělo být jediným parametrem pro stanovení diagnózy a léčby, ale měl by být podpořen dalšími klinicky relevantními daty.

## ZAJIŠTĚNÍ JAKOSTI

Všem klinickým laboratořím je v rámci interního programu pro zajišťování jakosti doporučováno provádět kontrolu postupu stanovením kontrolních vzorků o hodnotách koncentrací při horní i při dolní hranici rozsahu.

Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní přijatelný rozsah vnitřních kontrol používaných v dané laboratoři. Střední hodnota rozsahu kontrolních vzorků má spadat do přijatelného rozsahu uváděného výrobcem. Pro stanovení hodnot kontrolních vzorků se doporučuje použít soupravy nejméně ze dvou různých šarží.

## VÝPOČET VÝSLEDKŮ

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

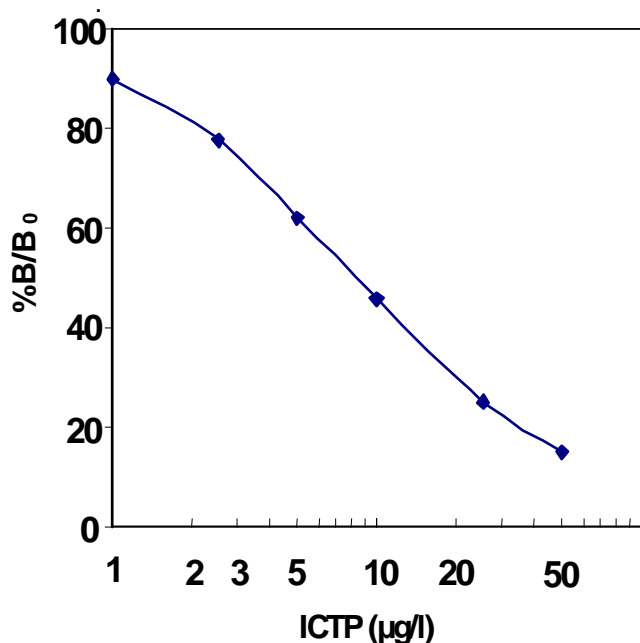
**Vypočtete** střední hodnotu četností pro všechny kalibrátory, vzorky a kontroly.

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

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

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

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



Zkumavka	Průměr cpm	cpm-NSB	%B/B <sub>0</sub>	ICTP (μg/l)
Celková aktivita	45459			
NSB	1619			
Kalibrátor 0	20330	18711		
Kalibrátor 1.0	18480	16861	90,1	
Kalibrátor 2.5	16181	14561	77,8	
Kalibrátor 5.0	13276	11657	62,3	
Kalibrátor 10	10126	8507	45,5	
Kalibrátor 25	6293	4674	25,0	
Kalibrátor 50	4456	2837	15,2	
Neznámý vzorek 1	12319	10700	46,0	8,8
Neznámý vzorek 1	8110	6491	27,9	24,3

**Obr. 1** Typická kalibrační křivka. Příklad. (str. 8 originální příbalové informace)

**Tabulka 1** Výpočet výsledků při Příklad použití typických údajů.

## REFERENČNÍ INTERVALY

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

Referenční hodnoty sérových hladin ICTP byly měřeny u zjevně zdravých dospělých osob ve věku 19-74 let soupravou ICTP RIA. Ke kalkulaci intervalů pro dolní a horní mez bylo použito neparametrické metody doporučené IFCC.

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

	<b>Ženy</b>	<b>Muži</b>
Počet sledovaných osob	146	125
Průměr	3,5 µg/l	3,2 µg/l
Referenční interval*	<b>2,1– 5,6 µg/l</b>	<b>2,1 – 5,0 µg/l</b>
0,90 intervaly spolehlivosti		
pro dolní referenční mez	2,1 – 2,4 µg/l	1,9 – 2,2 µg/l
pro horní referenční mez	4,9 – 6,2 µg/l	4,4 – 5,7 µg/l

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

Hodnoty ICTP pro děti byly určeny podle populace zdravých dětí ve věku 0 měsíců až 18 let (nepublikovaná data). Hodnoty jsou pouze orientační.

**Tabulka 3** Typické hodnoty koncentrací ICTP u dětí.

<b>Věková skupina</b>	<b>Dolní mez (µg/l)</b>	<b>Střední hodnota (µg/l)</b>	<b>Horní mez (µg/l)</b>
Chlapci a dívky			
0 – 3 měsíce	51	61	71
3 – 6 měsíce	23	32	40
6 – 12 měsíce	15	22	30
1 – 2 roky	12	16	20
2 – 9 let	7	11	16
Chlapci			
9 – 13 let	8	11	15
13 – 16 let	10	16	23
16 – 18 let	8	9	11
Dívky			
9 – 11 let	9	12	15
11 – 14 let	10	13	16
14 – 16 let	6	10	14
16 – 18 let	4	5	7

## ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

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

### Měřící rozmezí

1,0 - 50 µg/l.

### Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnoty nulového kalibrátoru, je přibližně 0,4 µg/l.

### Linearita/Linearity

Linearita byla sledovaná zředěním 5 vzorků séra nulovým kalibrátorem (0 µg/l). Průměrný výtěžek ze vzorků byl 102 %.

### Metoda standardního přídávku (recovery)

Známa množství (18,9, 41,4 a 61,9 µg/l) ICTP byla přidána ke vzorkům pěti patientských sér obsahujících 3,8 – 5,2 µg/l ICTP. Standardní přídávky se pohybovaly v rozmezí 96 - 106 % s průměrnou hodnotou 101 %.

### Preciznost (precision)

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

**Tabulka 4.** Intra-assay/ inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 20 replikátů			Inter-assay preciznost 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (µg/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (µg/l)	CV (%)
1	6,8	4,8	5	5,5	5,6
2	3,7	3,5	6	8,9	7,6
3	14,7	6,3	7	21,3	9,0
4	24,5	9,4	8	17,3	6,4

### Interferující látky

Sérový bilirubin do koncentrace < 400 µmol/l a hemoglobin do koncentrace < 5 g/l neinterferují s měřením. Nedoporučujeme používat lipemická sera (triglyceridy do koncentrace < 5 g/l neinterferují).

**Specificita**

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

# UniQ ICTP RIA

C-terminální telopeptid kolagenu typu I  
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou  
protilátkou  
Kat.č. 68601

## Obsah soupravy (100 testů)

*ICTP RIA tracer:* ICTP RIA radioindikátor  
*ICTP RIA antiserum:* ICTP RIA antisérum  
*ICTP RIA calibrators:* ICTP RIA kalibrátory  
*ICTP RIA controls:* ICTP RIA kontroly  
*ICTP RIA separation reagent:* ICTP RIA separační reagencie

## Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v  $\mu$ l)

	<b>Celková aktivita</b>	<b>NSB</b>	<b>Kalibrátor</b>	<b>Kontrolní séra a séra pacientů</b>
<b>Napipetujte vzorek</b>		100	100	100
<b>Napipetujte radioindikátor (červený)</b>	200	200	200	200
<b>Napipetujte antisérum (modré)</b>			200	200
<b>Napipetujte destilovanou vodu</b>		200		
<b>Míchejte</b>		X	X	X
<b>Inkubujte 2 hodiny při 37°C</b>		X	X	X
<b>Napipetujte separační reagencii</b>		500	500	500
<b>Promíchejte</b>		X	X	X
<b>Inkubujte 30 min. při pokojové teplotě</b>		X	X	X
<b>Centrifugujte 30 minut při 2000 g</b>		X	X	X
<b>Dekantujte</b>		X	X	X
<b>Měřte 1 min nebo 10 000 impulzů</b>	X	X	X	X

UniQ<sup>®</sup> je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy.

132033-CZ06

Sídlo výrobce v ČR (zastoupení pro ČR, HU, PL a SR):

Orion Diagnostica-organizační složka  
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6  
Tel. +420 233 350 533, Fax:+420 233 350 532  
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz  
www.oriondiagnostica.cz