



COMP[®] ELISA

Enzyme Immunoassay

- Directions for Use, 3-12**
- Gebrauchsanweisung, 13-22**
- Mode d'emploi, 23-33**
- Instrucciones de uso, 35-44**
- Istruzioni per l'uso, 45-54**
- Aanwijzingen voor gebruik, 55-64**
- Instruções de Utilização, 65-74**
- Bruksanvisning, 75-84**
- Brugsanvisning, 85-94**





INTENDED USE

The COMP ELISA is a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in human serum. The presence of elevated levels, when considered in conjunction with other laboratory and clinical findings, is an aid in identifying aggressive destruction of joint tissue in diseases such as rheumatoid arthritis (RA).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

COMP was first described in 1992 by the research group of Professor Dick Heinegård (1), University of Lund, Sweden. The molecule is a pentameric protein of five identical disulfide-linked subunits (2) with a total molecular mass of 434 kDa (3). COMP was first described in cartilage (1) but has recently also been found in tendons (4) and synovial membranes (5). It has not been possible to detect COMP in culture medium from other connective tissue such as skin or lung tissue (6).

It is well documented (7,8,9,10) that when articular cartilage matrix is degraded by a disease process, protein fragments are produced and diffuse out into the joint fluid. Some of these proteins, such as COMP, subsequently appear in the bloodstream and can be used to monitor the progress of cartilage degradation in inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis (8,11) and osteoarthritis (12,13, 14). A quantitative relation has been shown between the concentrations of COMP in serum and cartilage degradation (10) using radiographic changes as a surrogate clinical endpoint. This has been further proved in experimentally induced arthritis in animal models where the COMP serum level was highly correlated to the severity of arthritis (15,16) and also to the clinical joint score and histopathological signs of cartilage erosion (16).

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

COMP ELISA is a solid-phase, two-site enzyme immunoassay. It is based on the direct sandwich technique in which two monoclonal antibodies are directed against separate antigenic determinants on the COMP molecule. During incubation, COMP in the sample reacts with peroxidase-conjugated anti-COMP antibodies and anti-COMP antibodies bound to the microtitration well. A simple washing step removes unbound enzyme-labeled antibody. The bound conjugate is detected by a reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). This reaction is stopped by adding acid to give a colorimetric endpoint that is read spectrophotometrically.

REAGENTS

Each COMP ELISA kit contains reagents for 96 wells, which is sufficient for one calibrator curve, a blank, two controls and 40 samples in duplicate. For larger series of assays, use pooled reagents from packages bearing identical lot numbers. The expiry date for the complete kit is stated on the outer label. The recommended storage temperature is 2-8 °C.

Anti-COMP Coated Plate (Mouse monoclonal antibodies)	1 plate 96 wells 8-well strips	Ready for use Store at 2-8 °C until expiry date. For unused microtitration strips, reseal the bag and store at 2-8 °C for two months.
Calibrators (human COMP in buffer) Concentration indicated on vial label	5 vials 1.0 ml	Lyophilized Store at 2-8 °C until expiry date Add 1.0 ml distilled water per vial.* Reconstituted calibrator: store at 2-8 °C for 4 weeks or at -20 °C until expiry date.
Sample Buffer	2 vials 7.5 ml	Ready for use Store at 2-8 °C until expiry date.
Enzyme Conjugate 11x Peroxidase-anti-COMP (Mouse monoclonal antibodies, ~ 10 µg/ml)	1 vial 1.3 ml	Concentrate Store at 2-8 °C until expiry date. Preparation, see table. Do not freeze!
Conjugate Buffer Color coded blue	1 vial 13 ml	Ready for use Store at 2-8 °C until expiry date.
Wash tablets	2 tablets	Dissolve each tablet in 500 ml distilled water. Store wash solution at 2-8 °C. Use within 4 weeks.
Enzyme Substrate (TMB)	1 vial 22 ml	Ready for use Store at 2-8 °C until expiry date. Light sensitive!
Stop Solution** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 vial 7 ml	Ready for use Store at 2-8 °C until expiry date.
Control 1 (human COMP in buffer)	1 vial 0.5 ml	Lyophilized Add 0.5 ml distilled water.* Reconstituted control: store at 2-8 °C for 4 weeks or at -20 °C until expiry date.
Control 2 (human COMP in buffer)	1 vial 0.5 ml	Lyophilized Add 0.5 ml distilled water.* Reconstituted control: store at 2-8 °C for 4 weeks or at -20 °C until expiry date.

*Note! Make sure that all lyophilized reagents are properly dissolved.

**Material Safety Data Sheet is available upon request

PREPARATION AND HANDLING OF SAMPLES AND ENZYME CONJUGATE

Samples

Blood should be collected by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated by centrifugation. Specimens can be stored at room temperature (for shipping purpose only), at 2-8 °C if assayed within one week after collection, or at -20 °C if assayed later.

Heparin plasma can also be used.

Note! EDTA plasma and citrate plasma cannot be used.

Contact AnaMar for advice regarding measurement of COMP in other body fluids.

Preparation of samples and controls

Samples and controls should be diluted 1/10 in sample buffer.

(20 µl serum + 180 µl sample buffer.)

Preparation of Enzyme Conjugate

Prepare the enzyme conjugate by dilution of enzyme conjugate 11X, (1+10) in conjugate buffer.

Note: Conjugate volumes are preferably adjusted by diluting all at once. In other words, pour all of the buffer into the conjugate vial.

Mix gently. Store diluted conjugate at 2-8 °C for up to four weeks.

Or prepare the needed volume according to the table below. Mix gently.

Number of strips	Enzyme Conjugate 11X	Conjugate Buffer
4 strips	350 µl	3.5 ml
6 strips	500 µl	5.0 ml
12 strips	1 vial	1 vial

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use. Not for internal or external use in humans or animals.
- The contents of this kit and their residues must not be allowed to come into contact with ruminating animals or swine.

This kit contains reagents that may be infectious!

This kit contains reagents manufactured from human blood components. The source material has been tested by immunoassay for hepatitis B surface antigen and for antibodies for HIV virus and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for handling blood derivatives should be observed. Please refer to HHS Publication no. (CDC) 88-8395 or corresponding local/national guidelines on laboratory safety procedures.

The Stop Solution consists of dilute sulfuric acid solution. Avoid exposure to bases, metals, or other compounds that may react with acids. Sulfuric acid is a poison and corrosive, which may be toxic if ingested. To prevent chemical burns avoid contact with skin and eyes.

PROCEDURE

Parameters of the Procedure

Volumes per well:

Sample	25 µl
Conjugate	100 µl
Enzyme Substrate	200 µl
Stop Solution	50 µl

Incubation Time and Temperature:

1st incubation	120 min. on a plate shaker at room temperature, 20-28 °C, (RT).
2nd incubation	15 min. at RT

Materials Required but not Provided

- 25 µl micropipette with disposable tips
- 50 µl, 100 µl and 200 µl repeating pipettes
- 1000 ml beaker
- Distilled water
- EIA plate reader with 450 nm filter
- Plate shaker
- Wash device for microtitration plates

Reference Material

COMP Calibrators are calibrated against an in-house standard correlated to the COMP inhibition assay described by Saxne and Heinegård in *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood*, published in British Journal of Rheumatology vol 31 pp 583-591 (1992).

Interference

Components have been added to reagents in the kit to prevent interference from mouse- and RF-antibodies present in the patient sera.

Test Procedure

Prepare a calibrator curve for each assay run. All reagents and samples must be brought to room temperature before use. Controls should be treated as samples. We recommend that each determination for calibrators and unknowns is performed in duplicate.

Add to anti-COMP wells

1. Calibrators	25 µl
2. Diluted controls and diluted samples	25 µl
3. Enzyme conjugate	100 µl
4. Incubate on a shaker and shake intensely (eg 250 rpm, Ø 16mm) for 2 hours at room temperature at setting.	
5. Wash 6 times with automatic washer, or: Aspirate the reaction volume. Add 350 µl Washing solution to each well. Aspirate completely. Repeat 5 times. After the final wash, invert and tap the plate firmly against absorbent paper.	
6. Add 200 µl enzyme substrate (TMB)	
7. Incubate for 15 minutes	
8. Add 50 µl stop solution.	
9. Put the plate on the shaker for approximately 5 seconds to ensure mixing of substrate and stop solution.	
10. Measure absorbance at 450 nm and evaluate.	

Quality Control

- The absorbance of the lowest COMP ELISA Calibrator should be greater than the absorbance of the COMP ELISA sample buffer.
- The COMP ELISA Control 1 and 2 concentrations should be within the range of the values stated on its label.

For each lot of controls, the concentrations of COMP have been determined using COMP ELISA from AnaMar. The mean value and standard deviation are stated on the respective vial label. Each mean value is based on six replicates in six consecutive runs.

As with all immunoassays, the results are affected by the testing procedures and equipment used by different laboratories. It is therefore recommended that each laboratory establish its own mean values and criteria of acceptance (e.g. 2 S.D. or 3 S.D.). A range of ± 2 S.D. should encompass 95% of the single determinations in a data set with normal distribution.

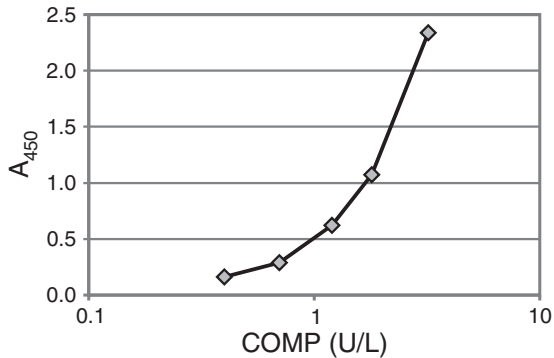
Example of Worksheet

Wells	Identity
1A-B	Sample buffer, (blank)
1C-D	Calibrators 0.4 U/L*
1E-F	Calibrators 0.7 U/L*
1G-H	Calibrators 1.2 U/L*
2A-B	Calibrators 1.8 U/L*
2C-D	Calibrators 3.2 U/L*
2E-F	Control 1
2G-H	Control 2
3A-B	Unknown1

*Concentration indicated on vial label.

Calibrator curve

A typical calibrator curve is shown below. Do not use this curve to determine actual assay results.



CALCULATION OF RESULTS

Computerized calculation

Computerized data reduction of absorbance for the Calibrators versus the concentration using Cubic Spline regression or four parameter regression may be performed to obtain the concentration of COMP. Multiply the concentration of the unknown samples with the dilution factor (eg. X 10).

Manual calculation

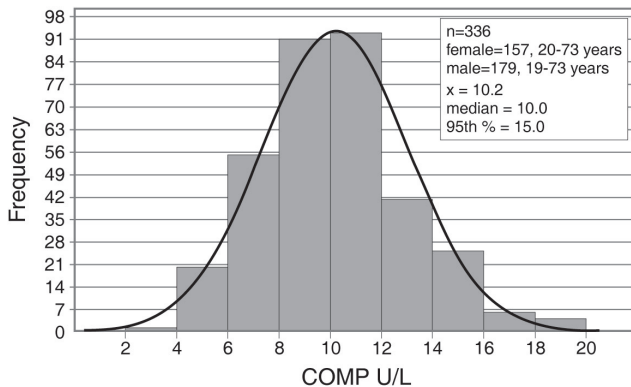
1. Plot the absorbance values obtained for the calibrators against the COMP concentration on a lin-log paper and construct a calibrator curve.
2. Read the concentration of the unknown samples from the calibrator curve.
3. Multiply the results by the dilution factor (x10).

EXPECTED VALUES

Expected values in blood donors

Good practice dictates that each laboratory establishes its own expected range of values. The following results may serve as a guide until the laboratory has gathered sufficient data of its own.

All samples were serum samples collected from blood donors in Sweden.



COMP in Early and Late RA

In a study of 183 rheumatoid arthritis patients, the concentration of COMP at inclusion was related to the risk of extensive small joint destruction after 5 years. Odds ratio per COMP unit in serum was 1.21 (confidence interval (CI) 1.07-1.36, $p < 0.002$). These data were used to estimate the relative risk of developing joint destruction above the 75th percentile (Larsen Score > 59 of 200) after 5 years (17). Other data published by Skoumal M *et al.* indicate that this relation to small joint destruction is also seen in patients with long-standing disease (18).

Interpretation

The following guidelines may be used to assess ongoing cartilage turnover and the risk of joint destruction in the future.

< 12 U/L	Lower risk of aggressive joint destruction*
12-15 U/L	Increasing risk of aggressive joint destruction*
> 15 U/L	High risk of aggressive joint destruction*

* An elevated ESR further increased the risk of aggressive joint destruction in RA (17).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Detection limit⁽¹⁾

The detection limit is < 0.1 U/L.

Parallelism⁽¹⁾

Serum samples were diluted 10, 20, and 40 times using the sample diluent. The observed Obtained/Expected values for 1/20 and 1/40 were in the range 93-116%.

Hook Effect⁽¹⁾

Samples diluted 1/10 can have a concentration up to at least 200 U/L without giving incorrectly low concentrations.

Precision⁽¹⁾

Each sample was analysed in 4-replicates on six different occasions.

Sample	Mean value U/L	Coefficient of variation		
		within assay %	between assay %	total assay %
1	6.9	3.0	1.8	3.5
2	13.1	1.9	2.7	3.3
3	18.0	1.7	4.2	4.5

Notes

⁽¹⁾Studies performed at AnaMar Medical, Uppsala, Sweden

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A definitive clinical diagnosis should not be based on any single diagnostic method, but should only be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

WARRANTY

The performance data presented here were obtained using the recommended procedure indicated. Any change or modification in the procedure not recommended by AnaMar Medical may affect the results, in which event AnaMar Medical disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and fitness for use.

In such an event, AnaMar Medical and its authorized distributors shall not be liable for damages indirect or consequential.

EXPLANATION OF SYMBOLS USED ON LABELS



n=96

Reagents for 96 determinations



Expiry date



2-8°C

Store at 2-8°C



Lot no



For In Vitro Diagnostic Use



Manufactured by

VERWENDUNGSZWECK

COMP ELISA ist ein Festphase-Enzym-Immunoassay zur Bestimmung des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins (COMP) in Humanserum. Die Anwesenheit erhöhter Werte, unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde, ist eine Hilfe bei der Identifizierung voranschreitender Zerstörung von Gelenkgewebe bei Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis (RA).

ZUSAMMENFASSUNG DES TESTS

COMP wurde erstmalig 1992 von der Forschergruppe von Professor Dick Heinegård (1) der Universität Lund, Schweden, beschrieben. Bei dem Molekül handelt es sich um ein pentameres Protein bestehend aus fünf identischen Untereinheiten mit Disulfidbindung (2) und einem Molekulargewicht von 434 kDa (3). COMP wurde anfangs in Knorpel (1) beschrieben, wurde allerdings jüngst auch in Sehnen (4) und Synovialmembranen (5) festgestellt. Bislang war der Nachweis von COMP in Gewebekultur anderer Bindegewebsarten wie z. B. Haut oder Lunge nicht möglich (6).

Eindeutig dokumentiert ist (7,8,9,10), dass beim krankhaften Abbau von Gelenknorpel, Fragmente des Matrixproteins entstehen und in die Gelenkflüssigkeit abgegeben werden. Einige dieser Proteine, wie z.B. auch COMP, tauchen allmählich im Blutkreislauf auf und können zur Überwachung des Knorpelabbaues bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (8,11) und Arthrose (12,13,14) eingesetzt werden. Eine quantitative Korrelation zwischen COMP Konzentrationen in Serum und Knorpelabbau (10) wurde anhand von Röntgenaufnahmen nachgewiesen. Weitere Nachweise hierfür wurden auch bei experimentell induzierter Rheumatoider Arthritis im Tiermodell gefunden, wo der COMP-Serumspiegel eine signifikante Korrelation zur Schwere der Arthritis aufwies (15,16), aber auch mit dem klinischen Bild des Gelenkes und den histopathologischen Befunden der Knorpelerosion (16) übereinstimmte.

TESTPRINZIP

COMP ELISA ist ein Festphase-Enzym-Immunoassay, basierend auf der Direkt-Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale Antikörper gegen verschiedene Antigen-Determinanten des COMP-Moleküles gerichtet sind. Während der Inkubation reagiert COMP aus der Serumprobe mit Peroxidase-konjugierten Anti-COMP-Antikörpern einerseits und mit Anti-COMP-Antikörpern, die an die Oberfläche der Mikrotiterplattenkavität gebunden sind, andererseits. Mittels einer einfachen Waschstufe werden ungebundene, Enzym-markierte-Antikörper entfernt. Das gebundene Konjugat wird durch eine Reaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. Durch Zugabe einer säurehaltigen Lösung wird die Reaktion gestoppt, das gefärbte Endgemisch der Reaktion wird spektrophotometrisch gemessen und ausgewertet.

REAGENZIEN

Jeder COMP-ELISA-Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen, ausreichend für eine Kalibratorcurve, eine Blindprobe, zwei Kontrollproben in Doppelbestimmung. Für umfangreichere Analyseserien sollten Reagenzien mit identischen Chargennummern verwendet werden. Das Verfallsdatum des kompletten Kits steht auf dem Außenetikett. Der Testkit sollte bis zum Gebrauch bei 2-8 °C gelagert werden.

Anti-COMP beschichtete Platte (Monoklonaler Antikörper, Maus)	1 Platte 96 Kavitäten 8-Kavitäten je Streifen	Gebrauchsfertig <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i> <i>Unbenutzte Mikrotiterstreifen sind mit dem Trockenmittel in verschlossenem Folienbeutel noch 2 Monate bei 2-8 °C haltbar.</i>
Kalibratoren (Humanes COMP in Puffer) Auf dem Etikett des Fläschchens genannte Konzentration	5 Fläschchen 1.0 ml	Gefriergetrocknet <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i> 1.0 ml destilliertes Wasser per Fläschchen zugeben.* <i>Rekonstituierter Kalibrator: Lagerung bei 2-8 °C für 4 Wochen oder bei -20 °C bis zum Verfallsdatum.</i>
Proben-Puffer	2 Fläschchen 7.5 ml	Gebrauchsfertig <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i>
Enzymkonjugat 11x Peroxidase-anti-COMP (monoklonaler Antikörper, Maus, ~ 10 µg/ml)	1 Fläschchen 1.3 ml	Konzentrat <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i> Bereitung, siehe Tabelle. Nicht einfrieren!
Konjugatpuffer blau gefärbt	1 Fläschchen 13 ml	Gebrauchsfertig <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i>
Waschtabs	2 Tabletten	Jede Tablette in 500 ml destilliertem Wasser auflösen. <i>Lösung bei 2-8 °C aufbewahren und innerhalb von 4 Wochen verbrauchen.</i>
Enzymsubstrat (TMB)	1 Fläschchen 22 ml	Gebrauchsfertig <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i> Achtung! Lichtempfindlich!
Stopp-Lösung** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 Fläschchen 7 ml	Gebrauchsfertig <i>Lagerung bei 2-8 °C bis Verfallsdatum.</i>
Kontrolle 1 (human COMP in Puffer)	1 Fläschchen 0.5 ml	Gefriergetrocknet 0.5 ml destilliertes Wasser zugeben.* <i>Rekonstituierte Kontrolle: Lagerung 4 Wochen bei 2-8 °C oder bei -20 °C bis Verfallsdatum.</i>

Kontrolle 2 (human COMP in Puffer)	1 Fläschchen 0.5 ml	Gefriergetrocknet 0.5 ml destilliertes Wasser zugeben.* <i>Rekonstituierte Kontrolle: Lagerung 4 Wochen bei 2-8 °C oder bei -20 °C bis Verfallsdatum.</i>
---------------------------------------	---------------------	---

***Hinweis! Achten Sie darauf, dass alle gefriergetrockneten Reagenzien vorschriftsmäßig aufgelöst sind.**

****Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich.**

VORBEREITUNG VON UND UMGANG MIT PROBEN UND ENZYMKONJUGAT

Proben

Blut wird durch Venenpunktion entnommen, und das Serum wird nach Koagulation durch Zentrifugieren getrennt. Das Probenmaterial kann bei Raumtemperatur versandt oder, falls innerhalb einer Woche nach Entnahme analysiert, bei 2-8 °C, oder bei späterer Analyse bei -20 °C gelagert werden.

Es kann auch Heparin-Plasma verwendet werden.

Hinweis! EDTA-Plasma und Zitrat-Plasma sind für die Testung nicht geeignet.

Für Anleitungen zur COMP-Bestimmung aus anderen Körperflüssigkeiten setzen Sie sich bitte mit AnaMar Medical in Verbindung

Vorbereitung der Proben

Serumprobe und Kontrollen werden 1:10 mit dem Proben-Puffer verdünnt.
(20 µl Serum oder Kontrolle + 180 µl Verdünner).

Vorbereitung des Enzymkonjugats

Bereiten Sie das Enzymkonjugat durch Verdünnung des Enzymkonjugats 11x (1+10) im Konjugatpuffer vor.

Hinweis: Größere Konjugatmengen werden vorzugsweise durch eine sofortige Verdünnung der gesamten Menge hergestellt. Mit anderen Worten, gießen Sie den gesamten Puffer in das Konjugat Puffer-Fläschchen.

Vorsichtig mischen. Verdünntes Konjugat bei 2-8 °C bis zu vier Wochen aufbewahren.

Oder bereiten Sie die benötigte Menge gemäß der nachstehenden Tabelle zu. Vorsichtig mischen.

Streifenanzahl	Enzym Konjugat 11X	Konjugat Puffer
4 Streifen	350 µl	3.5 ml
6 Streifen	500 µl	5.0 ml
12 Streifen	1 Fläschchen	1 Fläschchen

WARNUNGEN

- NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK! Nicht für innere oder äußere Anwendung bei Mensch oder Tier.
- Der Inhalt dieses Kits und die Rückstände dürfen nicht mit Wiederkäuern oder Schweinen in Kontakt kommen.

Dieser Testkit enthält Reagenzien, die aus Bestandteilen menschlichen Bluts hergestellt sind.

Die Ausgangsmaterialien wurden mittels Immunoassays auf Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen und Antikörper gegen HIV-Virus mit negativem Ergebnis untersucht. Trotzdem sind alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen zum Umgang mit humanen Blutderivaten zu beachten. Siehe hierzu auch HHS-Veröffentlichung Nr. (CDC) 88-8395 oder entsprechende lokale/nationale Sicherheitsvorschriften.

Die Stopp-Lösung besteht aus einer verdünnten Schwefelsäurelösung. Der Kontakt mit Basen, Metallen oder anderen Stoffen die mit Säuren reagieren können, ist zu vermeiden. Schwefelsäure ist giftig und korrosiv und kann bei Verzehr tödlich wirken. Bitte Routinevorkehrungen für den Umgang mit gefährlichen Chemikalien beachten.

VERFAHREN

Parameter des Verfahrens

Volumina pro Bestimmung:

Probe	25 µl
Konjugat	100 µl
Enzymsubstrat	200 µl
Stop-Lösung	50 µl

Inkubationszeit und -temperatur:

1. Inkubation 120 Min. auf einem Plattenschüttelgerät bei Raumtemperatur, 20-28 °C, (RT)
2. Inkubation 15 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen.

Benötigtes, aber nicht mitgeliefertes Material

- 25 µl Präzisionspipette mit Einwegspitzen
- 50 µl, 100 µl und 200 µl Multipipetten
- 1000 ml Meßzylinder
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplatten-Photometer, mit 450 nm Filter
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten Waschgerät

Referenzmaterial

COMP Kalibratoren werden zu einem In-house Standard kalibriert, der von Saxne und Heinegård in *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovials fluid and blood*, veröffentlicht in British Journal of Rheumatology, Ausgabe 31, S. 583-591 (1992), beschriebenen COMP Inhibitionsbestimmung entspricht.

Interferenz

Den Reagenzien des Kit wurden Komponenten zur Vermeidung von Interferenzen von den in den Sera des Patienten vorhandenen Maus und RF-Antikörpern hinzugefügt.

Test Verfahren

Erstellen Sie für jeden Assaydurchlauf eine Kalibratorkurve. Sämtliche Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Zimmertemperatur gebracht werden. Kontrollen sollten wie Proben behandelt werden. Es wird empfohlen, Kalibratoren und Unbekannte in Doppelbestimmung zu testen.

Geben Sie folgende Reagenzien in die entsprechenden Anti-COMP Mikrotiter-Kavitäten

1. Kalibratoren	25 µl
2. Verdünnte Kontrollen und verdünnte Proben	25 µl
3. Enzymkonjugat	100 µl
4. 2 Std. Inkubation auf dem Schüttelgerät, bei Raumtemperatur. kräftig schütteln. (z.B.250 U/min, Ø 16mm)	

-
5. 6 mal mit dem Mikrotiterplatten-Waschgerät waschen oder:
 Reaktionsgemisch manuell absaugen. 350 µl Waschlösung zu jeder Kavität zugeben.
 Vollständig absaugen.
 Waschdurchgang 5 mal wiederholen.
 Waschpufferreste gründlich entfernen, indem die Kavitäten mit der Öffnung nach unten, mehrmals kräftig auf eine saugfähige Unterlage aufgeschlagen werden.

 6. 200µl Enzymsubstrat (TMB) zugeben.

 7. 15 Min. inkubieren bei Raumtemperatur

 8. 50 µl Stopp-Lösung zugeben.

 9. Die Mikrotiterplatte zur gründlichen Durchmischung von Substrat und Stopplösung 5 Sekunden lang auf dem Schüttelgerät schütteln.

 10. Die Absorption bei 450 nm messen und auswerten.

Qualitätskontrolle

- Die Absorption des niedrigsten COMP ELISA Kalibrators sollte über der Absorption des COMP ELISA Proben-Puffers liegen.
- Die COMP ELISA Kontrolle 1 und 2 Konzentrationen sollte innerhalb des auf den Etiketten angegebenen Wertebereichs liegen.

Für jede Kontrolle wurden die COMP-Konzentrationen mittels AnaMar COMP ELISA ermittelt. Der Mittelwert und die Standardabweichung sind auf dem jeweiligen Fläschchenetikett angegeben. Jeder Mittelwert basiert auf vier Wiederholungen in sechs aufeinander folgenden Testansätzen. Wie bei allen Immunoassays werden die Ergebnisse von den Testverfahren und -geräten der verschiedenen Labors beeinflusst. Daher wird empfohlen, daß jedes Labor seine eigenen Mittelwerte und Akzeptanzkriterien ermittelt (z.B. 2 S.D. oder 3 S.D.). Ein Bereich von ± 2 S.D. sollte 95 % der Einzelbestimmungen in einem Datenset mit normaler Verteilung umfassen.

Beispiel für eine Arbeitsblatt

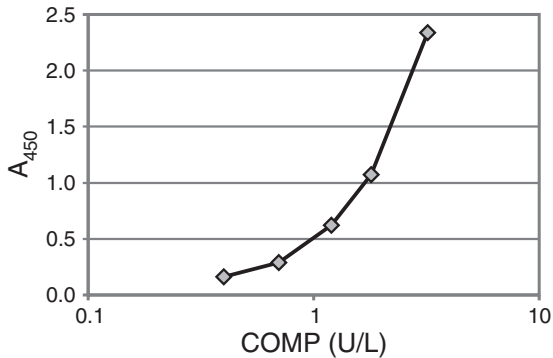
Kavitäten	Bezeichnung
1A-B	Proben-Puffer, (Blindprobe)
1C-D	Kalibratoren 0.4 U/L*
1E-F	Kalibratoren 0.7 U/L*
1G-H	Kalibratoren 1.2 U/L*
2A-B	Kalibratoren 1.8 U/L*
2C-D	Kalibratoren 3.2 U/L*

2E-F	Kontrolle 1
2G-H	Kontrolle 2
3A-B	Unbekannte Probe

*Auf dem Etikett des Fläschchens genannte Konzentration.

Kalibrationskurve

Weiter unten ist eine typische Kalibrationskurve dargestellt. Diese Kurve nicht zur Feststellung aktueller Probenergebnisse verwenden.



BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Computergestützte Berechnung

Zum Erhalt der Konzentration des COMP kann eine Computergestützte Datenreduktion des Absorptionsvermögens der Kalibratoren im Vergleich zu der Konzentration unter Verwendung der Kubische-Spline-Regression oder der Vier-Parameter-Regression durchgeführt werden. Die Konzentration der unbekannt Probe mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren (z.B. X 10).

Manuelle Berechnung

1. Die für die Kalibratoren erzielten Absorptionswerte gegenüber der COMP-Konzentration auf einem Lin-log-Papier eintragen und eine Kalibrationskurve bilden.

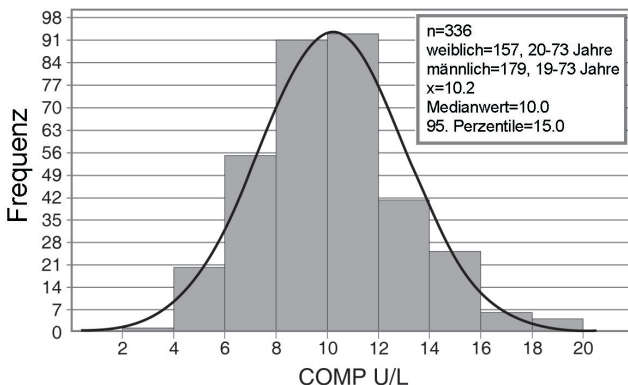
2. Die Konzentration der unbekanntenen Proben an der Kalibrationskurve ablesen.
3. Die Ergebnisse mit dem Faktor (x 10) multiplizieren.

ERWARTETE WERTE

Erwartete Werte von Blutspendern

Es wird empfohlen, in jedem Labor durch wiederholte Analysen, Mittelwerte und Akzeptanzbereiche für Kontrollen zu etablieren. Die nachfolgende Darstellung der Normalwerte ist als Richtlinie gedacht, bis das Labor genügend eigene Daten hat.

Sämtliche Proben waren Serumproben von Blutspendern in Schweden.



Klinische Relevanz des COMP-Wertes bei RA im Früh- und Spätstadium

In einer Studie an 183 Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde die COMP-Konzentration bei Beginn der Untersuchung in Bezug gesetzt zum Risiko einer Zerstörung der kleinen Gelenke nach 5 Jahren. Die ODDS Ratio je Serum-COMP Einheit betrug 1.21 (Vertrauensbereich von 1.07-1.36, $p < 0.002$). Diese Daten dienen zur Einschätzung des relativen Risikos, nach 5 Jahren eine Gelenkdestruktion zu entwickeln, oberhalb der 75. Perzentile (Larsson Score > 59 von 200) (17.) Vom Skoumal M et al veröffentlichte Daten weisen darauf hin, (PPV), dass dieser positive Vorhersagewert auch in Bezug zur Zerstörung der kleinen Gelenke bei Patienten mit seit langem bestehender Krankheit festzustellen ist (18).

Interpretation

Die folgenden Richtlinien können zur Bewertung des gegenwärtigen Knorpelumsatzes und des zukünftigen Risikos der Gelenkerstörung verwendet werden.

- < 12 U/L Geringes Risiko der aggressiven Gelenkerstörung*
- 12-15 U/L Erhöhtes Risiko der aggressiven Gelenkerstörung*
- > 15 U/L Hohes Risiko der aggressiven Gelenkerstörung*

* Eine erhöhte BSG steigerte das Risiko der aggressiven Gelenkerstörung in RA (17).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Nachweisgrenze⁽¹⁾

Die Nachweisgrenze beträgt <0,1 U/L.

Parallelismus⁽¹⁾

Serumproben wurden 1:10, 1:20 und 1:40 mit dem Proben-Puffer verdünnt. Der Quotient der Erhalten/Erwartet-Werte für 1/20 und 1/40 lag im Bereich 93-116 %.

Hook-Effekt⁽¹⁾

1/10 verdünnte Proben können eine Konzentration von bis zu mindestens 200 U/l erreichen ohne fehlerhaft niedrige Konzentrationen zu ergeben.

Präzision⁽¹⁾

Jede Probe wurde in 4-facher Wiederholung zu sechs verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Probe	Mittelwert U/L	Variationskoeffizient		
		Intra-Assay- Varianz %	Inter-Assay- Varianz %	Analyzen- Varianz %
1	6,9	3,0	1,8	3,5
2	13,1	1,9	2,7	3,3
3	18,0	1,7	4,2	4,5

Fußnote

⁽¹⁾ Bei AnaMar Medical, Uppsala, Schweden durchgeführte Studien

VERFAHRENSGRENZEN

Eine definitive klinische Diagnose sollte nicht auf einem einzelnen beliebigen Diagnoseverfahren basieren, sondern nur vom Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde vorgenommen werden.

HAFTUNG

Die hier angegebenen Leistungsdaten wurden im Rahmen des angegebenen empfohlenen Verfahrens ermittelt. Jegliche Änderung des Verfahrens, die nicht von AnaMar Medical empfohlen wurde, kann die Ergebnisse beeinträchtigen, so dass AnaMar Medical keine Gewährleistung, indirekt oder gesetzlich vorgeschrieben, einschließlich der indirekten Garantie der Markt- und Gebrauchsfähigkeit übernimmt. In einem solchen Fall haften weder AnaMar Medical noch seine Vertragshändler für direkte oder Folgeschäden.

ERKLÄRUNG DER AUF DEN ETIKETTEN VERWENDETEN SYMBOLE



n=96

Reagenzien für 96 Bestimmungen



Verfallsdatum



2-8°C

Aufbewahrung bei 2-8°C



Partienummer



Für in vitro Diagnostik



Hergestellt von

APPLICATION

Le test COMP ELISA est un dosage immunoenzymatique quantitatif qui utilise un antigène adsorbé pour détecter la protéine de la matrice cartilagineuse (COMP ou Cartilage Oligomeric Matrix Protein) dans le sérum humain. Conjointement aux examens cliniques et aux autres analyses de laboratoire, la présence de niveaux élevés de cette protéine est un moyen qui permet de déceler une destruction des tissus articulaires dans des maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR).

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

La molécule COMP a été décrite la première fois en 1992 par le groupe de recherche du Professeur Dick Heinegård (1) de l'Université de Lund en Suède. Cette molécule est une protéine pentamérique constituée de cinq sous-unités identiques à liaison bisulfure (2) d'une masse moléculaire totale de 434 kDa (3). Dans la description initiale de la molécule COMP, seuls les cartilages (1) étaient concernés mais on a récemment découvert sa présence dans les tendons (4) et les synoviales (5). Elle n'a pu être décelée dans des milieux de culture d'autres tissus conjonctifs tels que la peau ou les tissus pulmonaires (6).

Comme des documents (7,8,9,10) l'indiquent clairement, une dégradation pathologique de la matrice cartilagineuse articulaire s'accompagne d'une production de fragments de protéine qui se répandent dans le fluide articulaire. Certaines de ces protéines, telles que la molécule COMP, apparaissent peu à peu dans le sang et peuvent être utilisées pour surveiller la progression de la destruction cartilagineuse dans des maladies inflammatoires des articulations telles que la polyarthrite rhumatoïde (8,11) et l'arthrose (12,13,14). On a pu démontrer qu'il existe une corrélation quantitative entre les concentrations de la molécule COMP dans le sérum et la dégradation du cartilage (10) en utilisant les modifications radiographiques comme succédané clinique. Ceci a par ailleurs été prouvé dans le cas d'arthrite induite cliniquement chez l'animal où le niveau de sérum COMP était hautement lié à la sévérité de l'arthrite (15,16) ainsi qu'à l'image clinique de l'articulation et aux signes histopathologiques de l'érosion du cartilage (16).

PRINCIPE DU TEST

Le test COMP ELISA est un dosage immunoenzymatique sur deux sites en phase solide. Cette technique est basée sur la méthode sandwich directe. Dans cette méthode, deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre des épitopes différents de la molécule COMP. Lors de l'incubation, la molécule COMP présente dans l'échantillon réagit avec les anticorps anti-COMP conjugués à la peroxydase et avec les anticorps anti-COMP qui sont fixés au fond du puits de microtitration. Une simple phase de lavage permet d'enlever les anticorps marqués par l'enzyme non fixés. Le conjugué fixé est, quant à lui, mis en évidence par une réaction avec du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Pour stopper la réaction, on ajoute de l'acide afin d'obtenir une révélation colorimétrique qui est mesurée par spectrophotométrie.

RÉACTIFS

Les kits COMP ELISA contiennent chacun des réactifs pour 96 puits qui permettent de réaliser en double une courbe étalon, un échantillon à blanc, deux contrôles et 40 échantillons. Pour les séries d'analyses plus importantes, il faut utiliser des réactifs regroupés dans des emballages portant des numéros de lot identiques. La date limite d'utilisation de l'ensemble de la trousse d'immunodosage est indiquée à l'extérieur, sur l'étiquette. Il est recommandé de conserver les kits à une température de 2 à 8°C.

Plaque couverte d'anti-COMP Platte (Anticorps monoclonaux de souris)	1 plaque 96 puits par bande de 8	Prête à l'emploi <i>Conserver à une température de 2 à 8 °C jusqu'à la date limite d'utilisation</i> <i>S'il y a des bandes de puits de microtitration non utilisées, refermer hermétiquement le sachet et le conserver à une température de 2 à 8°C pendant deux mois.</i>
Calibrateurs (COMP humaine en tampon) Concentration indiquée sur l'étiquette du flacon	5 flacons 1.0 ml	Lyophilisés <i>Conserver à une température de 2 à 8°C jusqu'à la date limite d'utilisation</i> Ajouter 1,0 ml d'eau distillée par flacon.* <i>Calibrateur reconstitué : conserver à une température de 2 à 8°C pendant 4 semaines ou à -20°C jusqu'à la date limite d'utilisation.</i>
Tampon d'échantillon	2 flacons 7.5 ml	Prêt à l'emploi <i>Conserver à une température de 2 à 8°C jusqu'à la date limite d'utilisation.</i>
Enzyme Conjugate 11x (Conjugué enzymatique) (Anticorps monoclonaux de souris, ~ 10 µg/ml)	1 flacon 1.3 ml	Concentré <i>Conserver à une température de 2 à 8°C jusqu'à la date limite d'utilisation</i> Pour la préparation, voir le tableau. Ne pas congeler !
Tampon conjugué Coloration en bleu	1 flacon 13 ml	Prêt à l'emploi <i>Conserver à une température de 2 à 8°C jusqu'à la date limite d'utilisation.</i>
Tablettes de lessive	2 comprimés	Dissoudre chaque comprimé dans 500 ml d'eau distillée. <i>Conserver la solution à une température de 2 à 8°C. A utiliser dans les 4 semaines.</i>
Substrat enzymatique (TMB)	1 flacon 22 ml	Prêt à l'emploi <i>Conserver à une température de 2 à 8°C jusqu'à la date limite d'utilisation</i> Sensible à la lumière !

Solution d'arrêt** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 flacon	7 ml	Prêt à l'emploi <i>Conserver à une température de 2 à 8°C jusqu'à la date limite d'utilisation</i>
Contrôle 1 (COMP humaine en tampon)	1 flacon	0.5 ml	Lyophilisé Ajouter 0,5 ml d'eau distillée.* <i>Contrôle reconstitué : Conserver à une température de 2 à 8°C pendant.</i>
Contrôle 2 (COMP humaine en tampon)	1 flacon	0.5 ml	Lyophilisé Ajouter 0,5 ml d'eau distillée.* <i>Contrôle reconstitué : Conserver à une température de 2 à 8°C pendant.</i>

* **N. B. : S'assurer que tous les réactifs lyophilisés sont correctement dissous.**

****Les fiches techniques santé-sécurité sont disponibles sur demande.**

PRÉPARATION ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ ENZYMATIQUE

Échantillons

Le sang doit être recueilli par ponction veineuse. Une fois le sang coagulé, le sérum est séparé par centrifugation. Les échantillons peuvent être conservés à la température ambiante s'ils doivent être expédiés, à une température de 2 à 8°C si le test est réalisé dans la semaine qui suit la ponction veineuse ou à -20°C si le test est réalisé ultérieurement.

On peut également utiliser du plasma Héparine.

N. B. : Ne pas utiliser de plasma EDTA (édédate de sodium) ou du plasma citraté.

Pour le dosage de la molécule COMP dans d'autres liquides corporels, contacter AnaMar.

Préparation des échantillons et des contrôles

Les échantillons et les contrôles doivent être dilués au 1/10^{ème} dans le tampon d'échantillon.

(20 µl de sérum + 180 µl de tampon d'échantillon.)

Préparation du conjugué enzymatique

Préparer le conjugué enzymatique en diluant 11 fois (1+10) un volume du flacon "Enzyme Conjugate 11x" dans le tampon conjugué.

Note : Il est conseillé de préparer cette solution en diluant tout le produit en une seule fois. En d'autres termes, il faut verser tout le tampon dans le flacon du conjugué.

Bien mélanger. Conserver le conjugué dilué à une température de 2 à 8°C pendant au maximum quatre semaines.

On peut également préparer la quantité nécessaire en se référant au tableau ci-dessous. Bien mélanger.

Nombre de bandes	Enzyme Conjugate 11X	Tampon conjugué
4 bandes	350 µl	3.5 ml
6 bandes	500 µl	5.0 ml
12 bandes	1 flacon	1 flacon

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

- Uniquement pour usage diagnostic *in vitro*. À ne pas utiliser en usage interne ou externe chez l'homme ou l'animal.
- Les produits contenus dans ce kit et leurs résidus ne doivent pas être mis en contact avec un animal ruminant ou un cochon.

Ce kit contient des réactifs qui peuvent être infectieux!

Ce kit contient des réactifs fabriqués à partir de composants sanguins d'origine humaine. Le donneur a subi un dépistage négatif par immunoanalyse pour l'antigène de surface de l'hépatite B et pour les anticorps du virus HIV. Il faut cependant se conformer aux précautions et recommandations concernant le traitement des dérivés sanguins. Se référer à la publication de l'HHS n° (CDC) 88-8395 ou aux directives locales ou nationales sur les procédures de sécurité dans les laboratoires.

La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique dilué. Éviter tout contact avec des bases, des métaux ou d'autres composés pouvant réagir aux acides. L'acide sulfurique est un poison et un produit corrosif qui peut être toxique en cas d'ingestion. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux afin de prévenir tout risque de brûlure chimique.

PROCÉDURE

Volumes nécessaires par test

Volumes par puits :

Échantillon	25 µl
Conjugué	100 µl
Substrat enzymatique	200 µl
Solution d'arrêt	50 µl

Durée et température d'incubation :

1ère incubation	120 min. sur un agitateur de plaque à température ambiante, 20-28 °C.
2ème incubation	15 min. à température ambiante

Matériaux requis mais non fournis

- Micropipette de 25 µl avec pointes jetables
- Pipettes de répétition de 50 µl, 100 µl et 200 µl
- Éprouvette graduée de 1000 ml
- Eau distillée
- Lecteur de plaque EIA avec filtre à 450 nm
- Agitateur de plaque
- Laveuse pour plaques de microtitration

Document de référence

Les calibrateurs de COMP sont étalonnés en fonction d'une norme interne liée à l'essai d'inhibition COMP décrit par Saxne et Heinegård dans *Cartilage oligomeric matrix protein : A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood.* publié dans le British Journal of Rheumatology, vol. 31 pp 583 à 591 (1992).

Interférence

Pour éviter les interférences provoquées par les anticorps murins et par les anticorps à facteurs rhumatoïdes dans le sérum du patient, des composants ont été ajoutés au tampon conjugué.

Réalisation du test

Préparer une courbe étalon pour chaque manipulation. Tous les réactifs et les échantillons doivent être amenés à la température ambiante avant leur utilisation. Nous recommandons que chaque test soit effectué en double pour les calibrateurs et les échantillons inconnus.

Ajouter dans les puits anti-COMP

- | | |
|--|--------|
| 1. Calibrateurs | 25 µl |
| 2. Contrôles dilués et échantillons dilués | 25 µl |
| 3. Conjugué enzymatique | 100 µl |
| 4. Incuber sur un agitateur et secouer intensément (par ex. 250 tr/min, Ø16mm) pendant 2 heures, à la température ambiante, à la prise. | |
| 5. Laver chaque puits 6 fois avec le laveur automatique ou bien :
Aspirer le volume de réaction. Ajouter 350 µl de solution de lavage dans chaque puits.
Aspirer complètement. Répéter 5 fois cette opération.
Après le dernier lavage, retourner et taper fermement la plaque sur du papier absorbant. | |
| 6. Ajouter 200 µl de substrat enzymatique (TMB). | |
| 7. Incuber pendant 15 minutes. | |
| 8. Ajouter 50 µl de solution d'arrêt. | |
| 9. Placer la plaque sur l'agitateur pendant environ 5 secondes pour bien mélanger le substrat et la solution d'arrêt. | |
| 10. Mesurer l'absorbance à 450 nm et faire l'estimation. | |

Contrôle qualité

- L'absorbance du calibrateur COMP ELISA le plus bas doit être supérieure à l'absorbance du tampon COMP ELISA.
- Les concentrations des contrôles COMP ELISA 1 et 2 doivent être dans la plage des valeurs indiquée sur l'étiquette.

Pour chaque lot de contrôles, les concentrations de molécules COMP ont été déterminées en utilisant les tests COMP ELISA d'AnaMar. La valeur moyenne et l'écart type sont indiqués sur l'étiquette du flacon concerné. Chaque moyenne statistique est établie sur six valeurs réitérées au cours de six manipulations consécutives.

Comme c'est le cas avec toutes les immunoanalyses, les résultats dépendent des procédures et du matériel utilisés par les laboratoires lors des tests. Il est donc recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs moyennes et ses propres critères d'acceptation (par ex. 2 σ ou 3 σ). Pour un ensemble de données avec une distribution normale, 95 % des tests individuels doivent se trouver dans une plage de $\pm 2 \sigma$.

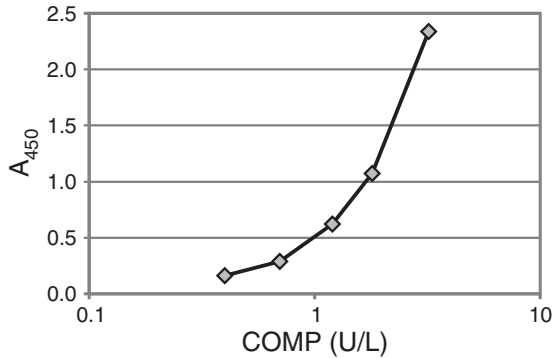
Exemple de grille de travail

Puits	Désignation
1A-B	Tampon d'échantillon
1C-D	0,4 U/L de calibrateurs*
1E-F	0,7 U/L de calibrateurs*
1G-H	1,2 U/L de calibrateurs*
2A-B	1,8 U/L de calibrateurs*
2C-D	3,2 U/L de calibrateurs*
2E-F	Contrôle 1
2G-H	Contrôle 2
3A-B	Échantillon inconnu 1

*Concentration indiquée sur l'étiquette du flacon.

Courbe d'étalonnage

On peut voir ci-dessous une courbe d'étalonnage type. Cette courbe ne doit pas être utilisée pour déterminer les résultats des dosages effectués.



CALCUL DES RÉSULTATS

Calcul informatique

Pour obtenir la concentration des molécules COMP, on peut réaliser une réduction des données informatiques d'absorbance pour les calibrateurs par rapport à la concentration en utilisant la régression de la spline cubique ou la régression à quatre paramètres. La concentration des échantillons inconnus doit être multipliée par le coefficient de dilution (par ex. x 10).

Calcul manuel

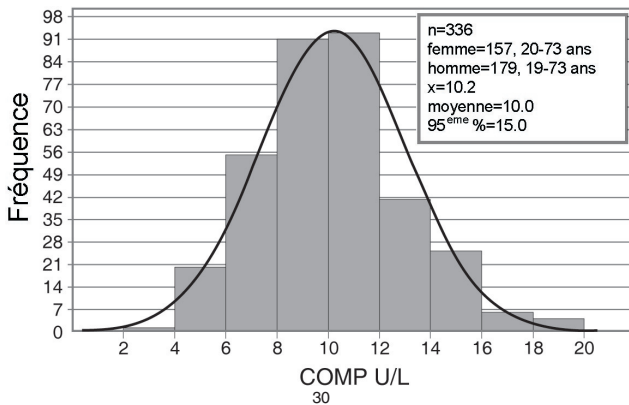
1. Placer les valeurs d'absorbance obtenues pour les calibrateurs en fonction de la concentration de molécules COMP sur un papier linéaire logarithmique et établir une courbe étalon.
2. Lire la concentration des échantillons inconnus à partir de la courbe étalon.
3. Multiplier les résultats par le coefficient de dilution (x10).

VALEURS ATTENDUES

Valeurs attendues chez les donneurs de sang

Il est de bonne pratique que chaque laboratoire établisse lui-même ses plages de valeurs attendues. Les résultats suivants peuvent servir de guide jusqu'à ce que le laboratoire ait réuni suffisamment de données.

Tous les échantillons sont des échantillons de sérum provenant de donneurs de sang suédois.



COMP et la PR au stade précoce et au stade final

Une étude portant sur 183 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde a montré qu'il existait une corrélation entre la concentration de COMP à l'inclusion et le risque de destruction étendue des petites articulations au bout de 5 années. Le rapport de cotes par unité de COMP dans le sérum était de 1,21 (intervalle de confiance (IC) 1,07 à 1,36, $p < 0,002$). Ces données ont servi à estimer le risque relatif de développement d'une liaison articulaire au dessus du 75^{ème} centile (Larsen Score > 59 de 200) après 5 années (17). D'autres données publiées par Skoumal M *et coll.* indiquent que cette corrélation à la destruction des petites articulations est également présente chez les patients atteints de maladies de longue durée (18).

Interprétation

Les lignes directrices suivantes peuvent servir à évaluer le renouvellement actuel du cartilage et le risque de destruction de l'articulation dans le futur.

< 12 U/L Risque peu élevé de liaison articulaire agressive*

12-15 U/L Augmentation du risque de liaison articulaire agressive*

> 15 U/L Risque élevé de liaison articulaire agressive*

* Avec la polyarthrite rhumatoïde (17), le risque de liaison articulaire agressive augmente encore davantage lorsque la vitesse de sédimentation est élevée.

VALEURS CARACTÉRISTIQUES

Limite de décèlement⁽¹⁾

La limite de décèlement est $< 0,1$ U/L.

Parallélisme⁽¹⁾

Des échantillons de sérum ont été dilués 10, 20 et 40 fois avec le diluant d'échantillon. Les rapports Valeurs obtenues/Valeurs attendues pour les dilutions 1/20 et 1/40 se situaient entre 93 à 116 %.

Effet Hook⁽¹⁾

La concentration des échantillons dilués dix fois peut atteindre au minimum 200 U/L sans que les concentrations obtenues soient incorrectement basses.

Précision⁽¹⁾

Pour chaque échantillon, on a analysé quatre répliques à six occasions différentes.

Échantillon	Valeur moyenne U/L	Coefficient de variation		
		% intra-essais	% inter-essais	% total essais
1	6,9	3,0	1,8	3,5
2	13,1	1,9	2,7	3,3
3	18,0	1,7	4,2	4,5

Notes

⁽¹⁾Études réalisées par AnaMar Medical, Uppsala, Suède

LIMITES DU TEST

Un diagnostic clinique définitif ne doit pas se baser sur une seule méthode de diagnostic et, ceci, quelle que soit cette méthode. Le médecin ne doit effectuer ce diagnostic qu'après avoir évalué tous les résultats cliniques et ceux des analyses de laboratoire.

GARANTIE

Les valeurs caractéristiques de performance mentionnées ici ont été obtenues en utilisant la procédure recommandée et indiquée. Toute modification ou tout changement du protocole qui ne seraient pas recommandés par AnaMar Medical pourraient affecter les résultats et, dans ce cas, AnaMar Medical rejeterait toute garantie explicite, implicite ou légale y compris la garantie implicite concernant le caractère propre à la commercialisation et l'adéquation à un usage particulier.

AnaMar Medical et ses distributeurs agréés ne pourront dans un tel cas être tenus pour responsables des dommages qui pourraient en résulter directement ou indirectement.

SIGNIFICATION DES SYMBOLES SUR LES ÉTIQUETTES



Réactifs pour 96 tests



Date limite d'utilisation



À conserver à une température de 2 à 8°C



Lot n°



Uniquement pour usage diagnostic in vitro



Fabriqué par



USO DESEADO

El COMP ELISA es un ensayo cuantitativo inmunoabsorbente ligado a enzimas que se utiliza para la detección de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP, Cartilage Oligomeric Matrix Protein) en suero humano. La presencia de niveles elevados, junto con otras conclusiones clínicas y de laboratorio, sirven de ayuda para poder identificar la destrucción agresiva de los tejidos de las articulaciones en enfermedades tales como, artritis reumatoide (AR).

SUMARIO Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

COMP fue descrita por primera vez en 1992 por el grupo de investigación del profesor Dick Heinegård (1) de la Universidad de Lund, Suecia. La molécula es una proteína pentamérica compuesta por cinco subunidades idénticas enlazadas por puentes de disulfuro (2) con una masa molecular total de 434 kDa (3). COMP fue descrita por primera vez en cartílago (1), pero últimamente ha sido encontrada también en tendones (4) y en membranas sinoviales (5). No ha sido posible detectar COMP en medio de cultivo de otros tejidos conjuntivos tales como la piel o tejido pulmonar (6).

Se ha documentado (7,8,9,10) que, cuando la matriz cartilaginosa articular se degrada debido a un proceso patógeno, se producen fragmentos de proteína que se difunden en el fluido de la articulación. Algunas de estas proteínas, tales como COMP, aparecen después en la circulación sanguínea y pueden utilizarse para controlar el progreso de la degradación del cartílago en enfermedades articulares inflamatorias tales como la artritis reumatoide (8,11) y la osteoartritis (12,13,14). Se ha demostrado la existencia de una relación cuantitativa entre las concentraciones de COMP en suero y la degradación del cartílago (10) usando cambios radiográficos como punto final clínico sustituto. Esto se ha demostrado con más detalle en artritis inducida experimentalmente en modelos animales, donde el nivel de suero COMP mostró una alta correlación con la gravedad de la artritis (15,16), al igual que con el test clínico articular y con signos histopatológicos de erosión cartilaginosa (16).

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

COMP ELISA es un inmunoensayo enzimático de dos sitios, de fase sólida. Se basa en la técnica directa tipo sándwich, en la que dos anticuerpos monoclonales son dirigidos contra determinantes antigénicos separados en la molécula COMP. Durante la incubación, COMP en la muestra reacciona con anticuerpos anti-COMP conjugados con peroxidasa y anticuerpos anti-COMP ligados al espacio de microtitulación. Un sencillo paso de lavado elimina el anticuerpo no ligado de marcación enzimática. El conjugado ligado se detecta por una reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Esta reacción se detiene añadiendo ácido para dar un punto final colorimétrico, que se lee de forma espectrofotométrica.

REACTIVOS

Cada kit de COMP ELISA contiene reactivos para 96 espacios, lo que es suficiente para una curva de calibración, uno vacío, dos controles y 40 muestras en duplicado. Para series de ensayos mayores, se deben usar reactivos agrupados de envases que lleven números de lote idénticos. La fecha de caducidad de todo el kit se indica en la etiqueta externa. La temperatura de conservación recomendada es de 2-8°C.

Placa revestida Anti-COMP (anticuerpos monoclonales de ratón)	1 placa 96 espacios tiras de 8 espacios	Listo para usar <i>Conservar a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.</i> <i>Las tiras de microtitulación que no se utilicen pueden volver a guardarse en la bolsa cerrada durante dos meses a una temperatura de 2-8 °C.</i>
Calibradores (COMP humana en amortiguador) Concent.: Concentración indicada en la etiqueta del vial	5 viales 1.0 ml	Liofilizado <i>Conservar a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.</i> Añadir 1,0 ml de agua destilada por vial.* <i>Estándar reconstituido: conservar a 2-8°C durante 4 semanas o bien, a -20°C hasta la fecha de caducidad.</i>
Amortiguador de muestra	2 viales 7.5 ml	Listo para usar <i>Conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.</i>
Conjugado enzimático 11x Anti-COMP conjugado con peroxidasa (anticuerpos monoclonales de ratón, ~ 10 µg/ml)	1 vial 1.3 ml	Concentrado <i>Conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.</i> Preparación, consulte la tabla. NO CONGELAR.
Amortiguador conjugado Color codificado azul	1 vial 13 ml	Listo para usar <i>Conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.</i>
Pastillas de lavado	2 pastillas	Disolver cada pastilla en 500 ml de agua destilada. <i>Conservar la solución a 2-8°. Utilizar dentro de un plazo de 4 semanas.</i>
Substrato enzimático (TMB)	1 vial 22 ml	Listo para usar <i>Conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.</i> SENSIBLE A LA LUZ.
Solución tope** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 vial 7 ml	Listo para usar <i>Conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.</i>

Control 1 (COMP humana en amortiguador)	1 vial	0.5 ml	Liofilizado Añadir 0,5 ml de agua destilada.* <i>Control reconstituido: conservar a 2-8°C durante una semana o a -20°C hasta la fecha de caducidad.</i>
Control 2 (COMP humana en amortiguador)	1 vial	0.5 ml	Liofilizado Añadir 0,5 ml de agua destilada.* <i>Control reconstituido: conservar a 2-8°C durante una semana o a -20°C hasta la fecha de caducidad.</i>

***Nota:** Debe asegurarse de que todos los reactivos liofilizados están disueltos del modo correcto.

****Si lo desea, puede solicitar la Hoja de datos sobre seguridad del material.**

PREPARACIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS Y CONJUGADO ENZIMÁTICO

Muestras

Extraer una muestra de sangre mediante venipuntura, permitir su coagulación y separar el suero mediante centrifugación. Las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente (sólo para transporte), a 2-8 °C si se va a realizar el ensayo a la semana, como máximo, de haber recogido la muestra o bien, a -20 °C si se va a posponer el ensayo.

También puede utilizarse plasma con heparina.

Nota: No se puede utilizar plasma-EDTA, ni plasma con citrato.

Si desea obtener información sobre la medición de COMP en otros fluidos corporales, póngase en contacto con AnaMar.

Preparación de muestras y controles

Las muestras y controles deben diluirse a 1/10 en amortiguadores de muestra. (20 µl de suero + 180 µl de amortiguador de muestra).

Preparación del conjugado enzimático

Para preparar el conjugado enzimático, debe diluir el frasco de Enzyme Conjugate 11X, (1+10) en amortiguador de conjugado enzimático.

Nota: Los volúmenes de conjugado se ajustan preferentemente diluyendo todo de una vez. En otras palabras, se debe verter todo el amortiguador en el vial de conjugado.

Mezclar suavemente. Conservar el conjugado diluido a 2-8 °C durante cuatro semanas como máximo.

O bien, prepare el volumen necesario del modo descrito en la tabla siguiente. Mezclar suavemente.

Número de tiras	Enzyme Conjugate 11X	Amortiguador de conjugado
4 tiras	350 µl	3.5 ml
6 tiras	500 µl	5.0 ml
12 tiras	1 vial	1 vial

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso en diagnósticos *in vitro*. No apto para uso externo o interno en seres humanos o animales.
- No permitir que el contenido de este kit y sus residuos entren en contacto con animales rumiantes, ni cerdos.

Este kit contiene reactivos que pueden ser infecciosos.

Este kit contiene reactivos fabricados a partir de componentes de la sangre humana. El material de origen se ha comprobado mediante inmunoensayo para antígenos de superficie para hepatitis B y para anticuerpos para el virus VIH y el resultado ha sido negativo. No obstante, se deberán respetar todas las precauciones recomendadas para el manejo de derivados de la sangre. Consulte la publicación N° 88-8395 (CDC) del Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. o bien, las correspondientes directrices nacionales/locales sobre los procedimientos de seguridad en laboratorios.

La solución tope está compuesta por una solución diluida de ácido sulfúrico. Evite la exposición a bases, metales u otros compuestos que puedan reaccionar con ácidos. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras provocadas por agentes químicos, evite cualquier contacto con la piel y los ojos.

PROCEDIMIENTO

Parámetros del procedimiento

Volúmenes por espacio:

Muestra	25 µl
Conjugado	100 µl
Substrato enzimático	200 µl
Solución tope	50 µl

Tiempo y temperatura de incubación:

1ª incubación	120 min. en un agitador de placas a temperatura ambiente, 20-28 °C, (TA)
2ª incubación	15 min. a TA

Materiales necesarios pero no suministrados

- Micropipeta de 25 µl con puntas desechables
- Pipetas de repetición de 50 µl, 100 µl y 200 µl
- Vaso para análisis de 1000 ml
- Agua destilada
- Lectora de placas EIA con filtro de 450 nm
- Agitador de placas
- Dispositivo de lavado para placas de microtitulación

Material de referencia

Los estándares COMP están calibrados contra un estándar *in-house* correlacionado para el ensayo de inhibición de COMP descrito por Saxne y Heinegård en *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood* publicado por el British Journal of Rheumatology Vol. 31 pp. 583-591 (1992).

Interferencia

Se han añadido componentes a los reactivos en el kit para evitar la interferencia que producen los anticuerpos de ratón y de FR presentes en los sueros de los pacientes.

Procedimiento de la prueba

Preparar una curva de calibración para cada serie de ensayos. Todos los reactivos y muestras tienen que tener la temperatura ambiente antes de usarlos. Los controles deben tratarse como las muestras. Se recomienda realizar las determinaciones de los estándar y los desconocidos por duplicado.

Añadir a espacios anti-COMP

1. Calibradores	25 µl
2. Muestras diluidas y controles diluidos	25 µl
3. Conjugado enzimático	100 µl
4. Incubar en agitador y agitar con intensidad (250 rpm, Ø 16mm) durante 2 horas a temperatura ambiente.	

-
5. Lavar 6 veces con lavador automático, o bien:
Aspirar el volumen de reacción. Añadir 350 µl de solución de lavado a cada espacio.
Aspirar completamente. Repetir 5 veces.
Después del último lavado, invertir y dar golpecitos a la placa firmemente contra papel secante.

 6. Añadir 200 µl de sustrato enzimático (TMB)

 7. Incubar durante 15 minutos

 8. Añadir 50 µl de solución tope.

 9. Poner la placa en el agitador durante unos 5 segundos para asegurar la mezcla del sustrato y la solución tope.

 10. Medir la capacidad de absorción a 450 nm y evaluar.

Control de calidad

- La absorción del más bajo calibrador de COMP ELISA debe ser mayor que la absorción de la muestra de COMP ELISA.
- Las concentraciones del Control 1 y 2 de COMP ELISA deben estar dentro del rango de los valores especificados en su etiqueta.

Por cada lote de controles, se han determinado las concentraciones de COMP usando COMP ELISA de AnaMar. El valor medio y la desviación típica se indican en la etiqueta del vial respectivo. Cada valor medio se basa en seis replicados en seis series consecutivas.

Como con todos los inmunoensayos, los resultados son afectados por los procedimientos de prueba y los equipos usados por distintos laboratorios. Por este motivo, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores medios y criterios de aceptación (por ej. 2 ó 3 desviaciones típicas). Un intervalo de ± 2 desviaciones típicas debe abarcar un 95% de las determinaciones singulares en un conjunto de datos con una distribución normal.

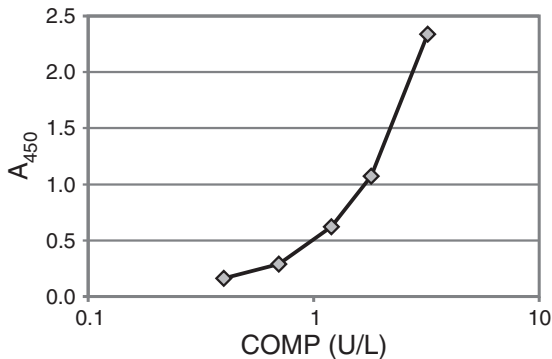
Ejemplo de ficha de trabajo

Espacios	Identidad
1A-B	Amortig. de muestra
1C-D	Calibrador 0.4 U/L*
1E-F	Calibrador 0.7 U/L*
1G-H	Calibrador 1.2 U/L*
2A-B	Calibrador 1.8 U/L*
2C-D	Calibrador 3.2 U/L*
2E-F	Control 1
2G-H	Control 2
3A-B	Desconocido 1

*Concentración indicada en la etiqueta del vial

Curva de calibración

Debajo se muestra una curva típica de calibración. No use esta curva para determinar los resultados del ensayo actual.



CÁLCULO DE RESULTADOS

Cálculo computerizado

Es posible realizar una reducción de datos computerizados de absorbencia para los estándar *versus* concentración mediante una regresión de cuatro parámetros o cúbica para obtener la concentración de COMP. Hay que multiplicar la concentración de las muestras desconocidas por el factor de dilución (es decir, X 10).

Cálculo manual

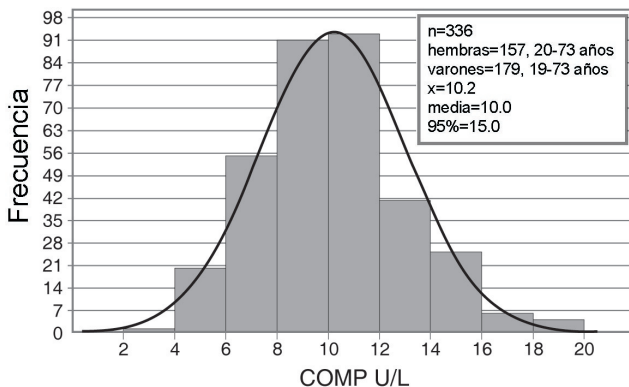
1. Trazar los valores de la capacidad de absorción obtenidos para los calibrador contra la concentración COMP en un papel cuadrículado logarítmico o en un papel lineal-logarítmico y construir una curva de calibración.
2. Leer la concentración de las muestras desconocidas en la curva de calibración.
3. Multiplicar los resultados por el factor de dilución (x10).

VALORES ESPERADOS

Valores esperados en donantes de sangre

La práctica generalmente aceptada prescribe que cada laboratorio establezca su propia gama esperada de valores. Los resultados siguientes pueden servir como guía hasta que el laboratorio haya recopilado suficientes datos propios.

Todas las muestras eran muestras de suero recogidas en donantes de sangre en Suecia.



COMP en AR temprana y tardía

En un estudio realizado en 183 pacientes con artritis reumatoide, la concentración de COMP en las inclusiones estaba relacionada con el riesgo de destrucción extensiva de articulación pequeña tras 5 años. La proporción por unidad COMP en suero era de 1,21 (intervalo de confianza (CI) 1,07-1,36, $p < 0,002$). Estos datos se utilizaron para estimar el riesgo relativo de desarrollar destrucción de articulación por encima del percentil 75^º (Escala Larsen > 59 de 200) después de 5 años (17). Otros datos publicados por Skoumal M *et al* indican que esta relación con la destrucción de articulación pequeña también se observa en pacientes con enfermedad antigua prolongada (18).

Interpretación

Utilizar las directrices siguientes para evaluar el estado actual del cartílago y el riesgo de destrucción articular futura.

< 12 U/L Disminución del riesgo de destrucción articular agresiva*

12-15 U/L Aumento del riesgo de destrucción articular agresiva *

> 15 U/L Alto riesgo de destrucción articular agresiva*

* Un nivel elevado de VSG aumenta aún más el riesgo de destrucción articular agresiva en AR (17)

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Límite de detección⁽¹⁾

El límite de detección es <0.1 U/L.

Paralelismo⁽¹⁾

Las muestras de suero fueron diluidas 10, 20 y 40 veces usando el diluyente de muestras. Los valores observados/Obtenidos/Esperados para 1/20 y 1/40 estuvieron en el intervalo 93-116%.

Efecto gancho⁽¹⁾

Las muestras diluidas a 1/10 pueden tener una concentración de, por lo menos, 200 U/l sin dar unas concentraciones bajas de forma incorrecta.

Precisión⁽¹⁾

Cada muestra fue analizada en 4 replicados en seis ocasiones distintas.

Muestra	Valor medio U/L	Coeficiente de variación		
		dentro del ensayo %	entre ensayos %	ensayo total %
1	6,9	3,0	1,8	3,5
2	13,1	1,9	2,7	3,3
3	18,0	1,7	4,2	4,5

Notas

⁽¹⁾Estudios realizados en AnaMar Medical, Uppsala, Suecia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en un único método diagnóstico, sino que debe ser hecho por el médico sólo después de haber sido evaluados todos los resultados clínicos y de laboratorio.

GARANTÍA

Los datos del funcionamiento aquí presentados fueron obtenidos usando el procedimiento recomendado indicado. Todo cambio o modificación del procedimiento, no recomendado por AnaMar Medical, puede afectar a los resultados, en cuyo caso AnaMar Medical rechaza todas las garantías explícitas, implícitas o legales, incluida la garantía implícita de comerciabilidad e idoneidad para el uso.

En tal caso, AnaMar Medical y sus distribuidores autorizados no serán responsables de los daños directos o consecuenciales.

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS



n=96

Reactivos para 96 determinaciones



Fecha de caducidad



2-8°C

Conservar a 2-8°C



Lote N°



Para diagnóstico *in-vitro*



Fabricado por

UTILIZZO PREVISTO

COMP ELISA è un saggio immunoenzimatico quantitativo per la determinazione della proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP) nel siero umano. La presenza di livelli elevati, se considerata in congiunzione con altre evidenze cliniche e di laboratorio, è di aiuto nell'identificare la distruzione aggressiva di tessuto delle articolazioni in malattie come l'artrite reumatoide (AR).

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La COMP è stata descritta per la prima volta nel 1992 dal gruppo di ricerca del professor Dick Heinegård (1), Università di Lund, Svezia. La molecola è una proteina pentamerica composta da cinque subunità identiche unite da ponti disolfuro (2) con una massa molecolare totale di 434 kDa (3). La COMP è stata descritta per la prima volta nella cartilagine (1) ma recentemente è stata trovata nei tendini (4) e nelle membrane sinoviali (5). Non è stato possibile rilevare la COMP nel terreno di coltura di altri tessuti connettivi come la pelle o il tessuto polmonare (6).

È stato documentato (7,8,9,10) che quando la matrice della cartilagine articolare è degradata da un processo patologico, frammenti proteici vengono prodotti e diffusi nel fluido articolare. Alcune di queste proteine, quali la COMP, appaiono successivamente nel circolo ematico e possono essere utilizzate per monitorare l'avanzamento della degradazione cartilaginea nelle patologie infiammatorie articolari quali l'artrite reumatoide (8,11) e l'osteoartrite (12,13,14). È stata evidenziata una relazione quantitativa tra la concentrazione della COMP nel siero e la degradazione cartilaginea (10), utilizzando modificazioni radiografiche come un endpoint clinico surrogato. Questo rapporto è stato ulteriormente dimostrato nell'artrite indotta sperimentalmente in modelli animali, nei quali il livello serico della COMP era altamente correlato alla gravità dell'artrite (15,16) e allo score clinico articolare e ai segni istopatologici di erosione cartilaginea (16).

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

COMP ELISA è un test immunoenzimatico a fase solida, a due siti. Si basa sulla tecnica a sandwich diretta nella quale due anticorpi monoclonali sono diretti contro determinanti antigenici separati sulla molecola della COMP. Durante l'incubazione, la COMP nel campione reagisce con gli anticorpi anti-COMP perossidasi-coniugati legati al pozzetto da microtitolazione. Una semplice fase di lavaggio rimuove l'anticorpo marcato con enzima non legato. Il coniugato legato viene rilevato tramite una reazione con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Questa reazione viene arrestata aggiungendo acido per attribuire un endpoint colorimetrico che viene letto spettrofotometricamente.

REAGENTI

Ogni kit COMP ELISA contiene reagenti per 96 pozzetti, sufficiente per una curva di taratura, una prova in bianco, due controlli e 42 campioni in doppio. Per una più ampia serie di saggi, utilizzare una combinazione di reagenti da confezioni con il medesimo numero di lotto. La data di scadenza del kit completo è indicata sull'etichetta esterna. La temperatura di stoccaggio raccomandata è di 2-8 °C.

Piastra rivestita di anti-COMP (anticorpi monoclonali di topo)	1 piastra 96 pozzetti strisce da 8 pozzetti	Pronto all'uso <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza. In caso di strisce di microtitolazione non utilizzate, risigillare il sacchetto e stoccare a 2-8 °C per due mesi.</i>
Calibratori (COMP umana in tampone) Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala	5 fiale 1.0 ml	Liofilizzati <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza</i> Aggiungere 1.0 ml di acqua distillata per fiala.* <i>Calibratore ricostituito: stoccare a 2-8 °C per 4 settimane o a -20 °C fino alla data di scadenza.</i>
Tampone campioni	2 fiale 7.5 ml	Pronto all'uso <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza</i>
Perossidasi-anti-COMP Enzima coniugato 11x (anticorpi monoclonali di topo, ~ 10 µg/ml)	1 fiala 1.3 ml	Concentrato <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza.</i> Preparazione, vedere tabella. Non congelare!
Tampone coniugato Codice colore blu	1 fiala 13 ml	Pronto all'uso <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza.</i>
Pastiglie di detersivo	2 compresse	Sciogliere ciascuna compressa in 500 ml di acqua distillata. <i>Conservare la soluzione ad una temperatura di 2-8° e utilizzare entro 4 settimane.</i>
Substrato enzimatico (TMB)	1 fiala 22 ml	Pronto all'uso <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza.</i> Sensibile alla luce!
Soluzione di arresto** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 fiala 7 ml	Pronto all'uso <i>Stoccare a 2-8 °C fino alla data di scadenza.</i>

Controllo 1 (COMP umana in tampone)	1 fiala	0.5 ml	Liofilizzato Aggiungere 0.5 ml di acqua distillata.* <i>Controllo ricostituito: stoccare a 2-8 °C per 4 settimane o a -20 °C fino alla data di scadenza.</i>
Controllo 2 (COMP umana in tampone)	1 fiala	0.5 ml	Liofilizzato Aggiungere 0.5 ml di acqua distillata.* <i>Controllo ricostituito: stoccare a 2-8 °C per 4 settimane o a -20 °C fino alla data di scadenza.</i>

***Nota! Assicurarsi che tutti i reagenti liofilizzati siano dissolti in modo corretto.**

****Le schede di sicurezza del materiale sono disponibili su richiesta.**

PREPARAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI E DELL'ENZIMA CONIUGATO

Campioni

Il sangue deve essere raccolto tramite venipuntura, consentendo il coagulo e quindi il siero deve essere separato per centrifugazione. I campioni possono essere stoccati a temperatura ambiente (a solo scopo di trasporto), a 2-8 °C se testati entro una settimana dalla raccolta o a -20 °C per test effettuati più tardi.

È anche possibile utilizzare plasma con eparina.

Nota! Il plasma con EDTA e il plasma con citrato non possono essere utilizzati.

Contattare AnaMar per una consulenza in merito alla misurazione della COMP in altri fluidi corporei.

Preparazione dei campioni e controlli

I campioni e i controlli devono essere diluiti 1/10 nel tampone campioni.

(20 µl siero + 180 µl tampone campioni.)

Preparazione dell'enzima coniugato

Preparare l'enzima coniugato per diluizione di enzima coniugato 11X, (1+10) in tampone enzima coniugato.

Nota: I volumi di coniugato vengono corretti preferibilmente diluendo in un unico passaggio. In altre parole, versare tutto il tampone nella fiala di coniugato.

Mescolare con cautela. Stoccare il coniugato diluito a 2-8 °C per un massimo di quattro settimane.

Oppure preparare il volume necessario in base alla tabella qui di seguito. Mescolare con cautela.

Número de strisce	Enzima coniugato 11X	Tampone coniugato
4 strisce	350 µl	3.5 ml
6 strisce	500 µl	5.0 ml
12 strisce	1 fiala	1 fiala

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per l'impiego diagnostico *in vitro*. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- I contenuti di questo kit e i loro residui non devono venire in contatto con animali ruminanti o suini.

Questo kit contiene reagenti che possono essere infettivi!

Questo kit contiene reagenti prodotti da componenti del sangue umano. Il materiale originale è stato controllata con test immunologico per l'antigene di superficie dell'epatite B e per anticorpi contro il virus HIV e trovato negativo. Ciononostante, dovrebbero essere osservate tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione di sangue. Fare riferimento alla pubblicazione HHS N. (CDC) 88-8395 o alle disposizioni locali/nazionali corrispondenti sulle procedure di sicurezza nei laboratori.

La Stop Solution consiste in una soluzione di acido solforico diluito. Evitare di esporla a basi, metalli o altri composti che possono reagire con gli acidi. L'acido solforico è un veleno ed è corrosivo che può essere tossico per ingestione. Per prevenire ustioni chimiche evitare il contatto con pelle e occhi.

PROCEDUR

Parametri della procedura

Volume per pozzetto:

Campione	25 µl
Coniugato	100 µl
Substrato enzimatico	200 µl
Stop solution	50 µl

Tempo di incubazione e temperatura:

1a incubazione	120 min. su un agitatore per piastre a temperatura ambiente, 20-28 °C, (TA).
2a incubazione	15 min. a TA

Materiali necessari ma non forniti

- Micropipetta da 25 µl con puntali monouso
- pipette a ripetizione da 50 µl, 100 µl e 200 µl
- becher da 1000 ml
- Acqua distillata
- Lettoce da piastre per test immunoenzimatici con filtro da 450 nm
- Agitatore per piastre
- Dispositivo di lavaggio per piastre da microtitolazione

Materiale di riferimento

I calibratori COMP sono calibrati rispetto ad uno standard interno correlato al saggio di inibizione della COMP descritto da Saxne e Heinegård in *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood*. pubblicato sul British Journal of Rheumatology vol 31 pp 583-591 (1992).

Interferenza

Sono stati inseriti reagenti nel kit per prevenire eventuali interferenze causate dalla presenza di anticorpi di topo e fattori reumatoidi presenti nel siero del paziente.

Procedura di test

Preparare una curva di calibrazione per ogni ciclo di saggio. Prima di essere utilizzati tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente. I controlli devono essere trattati come campioni. Si raccomanda di eseguire ogni determinazione in doppio per calibratori e incogniti.

Aggiunta ai pozzetti anti-COMP

- | | |
|---------------------------------|--------|
| 1. Calibratori | 25 µl |
| 2. Controlli e campioni diluiti | 25 µl |
| 3. Enzima coniugato | 100 µl |
- Incubare in un agitatore e agitare con forza (per es. 250 rpm, Ø 16mm) per 2 ore alla temperatura ambiente impostata.
 - Lavare 6 volte con una macchina automatica per il lavaggio, o:
Aspirare il volume di reazione. Aggiungere 350 µl di soluzione di lavaggio a ogni pozzetto.
Aspirare completamente. Ripetere 5 volte.
Dopo il lavaggio finale, capovolgere e picchiare con forza contro carta assorbente.

-
6. Aggiungere 200 µl di substrato enzimatico (TMB)
 7. Incubare per 15 minuti
 8. Aggiungere 50 µl di Stop solution.
 9. Porre la piastra sull'agitatore per circa 5 secondi per assicurare la miscelazione di substrato e Stop solution.
-
10. Misurare l'assorbanza a 450 nm e valutare.

Controllo di qualità

- L'assorbanza del calibratore COMP ELISA minimo deve essere superiore a quella del campione COMP ELISA.
- La concentrazione dei controlli 1 e 2 COMP ELISA deve essere compresa nell'intervallo di valori riportato sull'etichetta.

ControlsLe concentrazioni di COMP di ogni lotto di controlli sono state determinate utilizzando COMP ELISA di AnaMar. Il valore medio e la deviazione standard sono riportati sulle rispettive etichette delle fiale. Tutti i valori medi sono basati su sei repliche in sei cicli consecutivi.

Come per tutti i test immunologici, i risultati sono influenzati dalle procedure e dalle apparecchiature di prova utilizzate dai diversi laboratori. Pertanto si raccomanda che ogni laboratorio definisca i propri valori medi e criteri di accettazione (ad es. 2 D.S. o 3 D.S.). Un intervallo di ± 2 D.S. deve comprendere il 95% delle singole determinazioni in un set di dati con distribuzione normale.

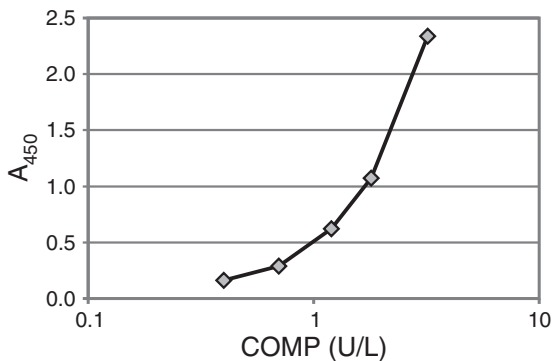
Esempio di foglio di lavoro

pozzetti	Identità
1A-B	Tampone campioni
1C-D	Calibratori 0.4 U/L*
1E-F	Calibratori 0.7 U/L*
1G-H	Calibratori 1.2 U/L*
2A-B	Calibratori 1.8 U/L*
2C-D	Calibratori 3.2 U/L*
2E-F	Controllo 1
2G-H	Controllo 2
3A-B	Ignoto1

*Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala.

Curva di taratura

In basso è mostrata una tipica curva di calibrazione. Non utilizzare questa curva per determinare i risultati dell'analisi.



CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolo computerizzato

Per ottenere la concentrazione di COMP, eseguire la riduzione computerizzata di assorbanza per i calibratori rispetto alla concentrazione, utilizzando la regressione spline cubica oppure a quattro parametri. Moltiplicare la concentrazione dei campioni ignoti per il fattore di diluizione (per es. per 10).

Calcolo manuale

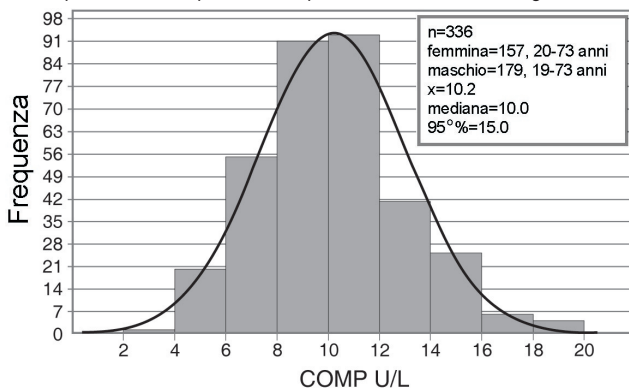
1. Tracciare i valori di assorbanza ottenuti per gli calibratore rispetto alla concentrazione di COMP su di un foglio di carta millimetrata semilogaritmica e costruire una curva di tatatura.
2. Leggere la concentrazione di campioni ignoti dalla curva di tatatura.
3. Moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione (x10).

VALORI ATTESI

Valori attesi in donatori di sangue

La buona pratica suggerisce che ogni laboratorio stabilisca il proprio intervallo di valori attesi. I risultati seguenti possono servire da guida finché il laboratorio ha raccolto dati sufficienti per proprio conto.

Tutti i campioni erano campioni di siero prelevati da donatori di sangue in Svezia.



COMP in AR in fase iniziale e avanzata

In uno studio su 183 pazienti affetti da artrite reumatoide, la concentrazione di COMP all'inclusione era correlata al rischio di distruzione estesa delle piccole articolazioni dopo 5 anni. Il rapporto di probabilità per unità di COMP nel siero è stata di 1.21 (intervallo di confidenza (IC) 1.07-1.36, $p < 0.002$). Questi dati sono stati utilizzati per stimare il rischio relativo di sviluppare distruzione articolare al di sopra del 75mo percentile (Score di Larsen > 59 su 200) dopo 5 anni (17). Altri dati pubblicati da Skoumal M *et al.* Indicano che questa correlazione con la distruzione delle piccole articolazioni è osservata anche in pazienti con patologie perduranti da lungo tempo (18).

Interpretazione

Le seguenti direttive possono essere utilizzate per valutare il ricambio di cartilagine in corso e il rischio di distruzione articolare in futuro.

- < 12 U/L **Basso rischio di distruzione articolare aggressiva***
- 12-15 U/L **Rischio crescente di distruzione articolare aggressiva***
- > 15 U/L **Rischio elevato di distruzione articolare aggressiva***

* Un livello elevato di ESR aumenta ulteriormente il rischio di distruzione articolare aggressiva in AR (17)

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Limite di rilevabilità⁽¹⁾

Il limite di rilevabilità è <0.1 U/L.

Parallelismo⁽¹⁾

I campioni di siero sono stati diluiti 10, 20 e 40 volte utilizzando il diluente campione. I valori ottenuti/attesi riscontrati per 1/20 e 1/40 erano nell'intervallo 93-116%.

Effetto gancio⁽¹⁾

I campioni diluiti a 1/10 possono presentare una concentrazione massima di almeno 200 U/L senza fornire concentrazioni incorrettamente basse.

Precisione⁽¹⁾

Ogni campione è stato analizzato in 4 repliche in sei diverse occasioni.

Campione	Valore medio U/L	Coefficiente di variazione		
		entro saggio %	tra saggio %	totale saggio %
1	6.9	3.0	1.8	3.5
2	13.1	1.9	2.7	3.3
3	18.0	1.7	4.2	4.5

Note

⁽¹⁾Studi effettuati alla AnaMar Medical, Uppsala, Svezia

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Una diagnosi clinica definitiva non deve basarsi su di un qualsiasi singolo metodo diagnostico, bensì deve essere effettuata solamente dal medico dopo che tutti i riscontri clinici e di laboratorio sono stati valutati.

GARANZIA

I dati sulla prestazione qui presentati si sono ottenuti utilizzando la procedura raccomandata indicata. Qualsiasi cambiamento o modifica della procedura, non raccomandati da AnaMar Medical può influenzare i risultati, nel qual caso AnaMar Medical nega tutte le garanzie espresse, implicite od obbligatorie, compresa quella implicita di commerciabilità e adeguatezza all'impiego.

In tale evento, AnaMar Medical ed i suoi distributori autorizzati non saranno responsabili di danni diretti o conseguenti.

SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE



n=96

Reagenti per 96 determinazioni



Data di scadenza



2-8°C

Stoccaggio a 2-8°C



Lotto n.



Per l'impiego diagnostico in vitro



Prodotto da

BEOOGD GEBRUIK

COMP ELISA is een kwantitatieve enzyme-linked immunosorbente analyse voor het bepalen van Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in menselijk serum. De aanwezigheid van verhoogde niveaus, bij afweging in samenhang met andere klinische en laboratoriumondervindingen, is een hulpmiddel bij het vaststellen van agressieve aantasting van gewrichtsweefsel bij ziektes als reumatoïde artritis (RA).

SAMENVATTING EN TOELICHTING OP DE TEST

COMP werd voor de eerste keer in 1992 beschreven door de researchgroep van professor Dick Heinegård (1) aan de Universiteit van Lund, Zweden. De molecule is een pentamerische proteïne van vijf identieke disulfide-geketende subunits (2) met een totale moleculaire massa van 434 kDa (3). COMP werd eerst beschreven in kraakbeen (1), maar is onlangs ook gevonden in spierpezen (4) en synoviaal vlies (5). Het is niet mogelijk geweest om COMP te ontdekken in kweken van andere bindweefsels zoals huid- of longweefsel (6).

Het is voldoende gedocumenteerd (7,8,9,10) dat er, wanneer gewrichtskraakbeenmatrix degenereert door een ziekteproces, proteïnefragmenten worden geproduceerd die via diffusie in de gewrichtsvloeistof komen. Een aantal van deze proteïnes, zoals COMP, komt zodoende ook in de bloedsomloop en kan worden gebruikt om de ontwikkeling van kraakbeendegradatie te controleren in inflammatoire gewrichtsaandoeningen zoals reumatoïde artritis (8,11) en osteoarthritis (12,13,14). Er is een kwantitatieve relatie aangetoond tussen de concentraties van COMP in serum en de kraakbeendegradatie (10) bij gebruik van radiografische veranderingen als een surrogaat klinisch eindpunt. Dit is nader bewezen in experimenteel opgewekte artritis in animale modellen waarbij de COMP serumspiegel in hoge mate in verband kon worden gebracht met de mate van artritis (15,16) en ook met klinische gewrichtswaarde en histopathologische tekenen van kraakbeenerosie (16).

PRINCIPE VAN DE PROCEDURE

COMP ELISA is een vastefase, tweezijdige enzymen immunoanalyse, gebaseerd op de direct sandwich methode waarbij twee monoclonale antistoffen naar aparte antigenen determinanten op de COMP molecule worden gericht. Tijdens de incubatie reageert COMP in de proef met peroxidase-geconjugeerde anti-COMP antistoffen en met anti-COMP antistoffen die zijn gebonden aan de microtitratie well. Een simpele wasprocedure verwijdert ongebonden, als enzym gemarkeerde antistoffen. De gebonden conjugatie wordt ontdekt door een reactie met 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Deze reactie wordt gestopt door zuur toe te voegen en om zodoende een colorimetrisch eindpunt teweeg te brengen dat spectrofotometrisch kan worden afgelezen.

REAGENTIA

Elke COMP ELISA kit bevat reagentia voor 96 wells, hetgeen voldoende is voor één kalibratiecurve, een blanco proef, twee controles en 40 monsters in tweevoudige uitvoering. Voor meer omvangrijke analyseseries dienen de gezamenlijke reagentia te worden gebruikt uit verpakkingen met identieke partijnummers. De vervaldatum voor de complete kit wordt op het label aan de buitenzijde vermeld. De aanbevolen opslagtemperatuur is 2-8°C.

Anti-COMP gecoate plaat (monoclonale antistoffen, oorsprong muis)	1 plaat 96 wells 8-well strips	Klaar voor gebruik <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum.</i> <i>Voor niet gebruikte microtitratiestrips: de zak weer hersluiten en bewaren bij 2-8°C gedurende hoogstens 2 maanden.</i>
Kalibratoren (menselijk COMP in buffer) Concentratie aangegeven op ampuletiket	5 ampullen 1.0 ml	Vriesgedroogd <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum</i> 1,0 ml gedistilleerd water per ampul toevoegen.* <i>Opgelost standaard: bewaren bij 2-8°C gedurende 4 weken of bij -20°C tot de vervaldatum.</i>
Monsterbuffer	2 ampullen 7.5 ml	Klaar voor gebruik <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum</i>
Enzymconjugaat 11x Peroxidase-anti-COMP (monoclonale antistoffen, oorsprong muis ~ 10 µg/ml)	1 ampul 1.3 ml	Concentraat <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum</i> Bereiden: zie de tabel. Niet bevriezen!
Conjugatiebuffer Kleurcode blauw	1 ampul 13 ml	Klaar voor gebruik <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum</i>
Reinigingstabletten	2 tabletten	Elke tablet oplossen in 500 ml gedistilleerd water. <i>Oplossing bewaren bij 2-8°C. Moet binnen 4 weken worden gebruikt.</i>
Enzymsubstraat (TMB)	1 ampul 22 ml	Klaar voor gebruik <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum</i> Lichtgevoelig!
Stopoplossing** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 ampul 7 ml	Klaar voor gebruik <i>Bewaren bij 2-8°C tot de vervaldatum</i>

Controle 1 (menselijk COMP in buffer)	1 ampul	0.5 ml	Vriesgedroogd 0,5 ml gedistilleerd water toevoegen.* <i>Opgeloste controle: bewaren bij 2-8°C gedurende 4 weken of bij -20°C tot de vervaldatum.</i>
Controle 2 (menselijk COMP in buffer)	1 ampul	0.5 ml	Vriesgedroogd 0,5 ml gedistilleerd water toevoegen.* <i>Opgeloste controle: bewaren bij 2-8°C gedurende 4 weken of bij -20°C tot de vervaldatum.</i>

*Opmerking! Zie erop toe dat alle vriesgedroogde reagentia goed worden opgelost.

**Veiligheidsinformatiebladen zijn op aanvraag verkrijgbaar.

VERZAMELING EN HANTERING VAN MONSTERS EN ENZYMCNJUGAAT

Monsters

Bloed dient te worden afgenomen door middel van venapunctie, stolling, en het serum moet gesepareerd worden door middel van centrifugering. Monsters kunnen worden bewaard op kamertemperatuur (alleen voor verzendingsdoeleinden), bij 2-8°C indien geanalyseerd binnen een week na afname, of bij -20°C in geval van latere analyse.

Er mag tevens heparineplasma worden gebruikt.

Opmerking! EDTA-plasma en citraatplasma mogen niet worden gebruikt.

Raadpleeg AnaMar voor adviezen betreffende de analyse van COMP in andere lichaamsvloeistoffen.

Monstervoorbereiding en controles

Monsters en controles moeten worden verdund met een 1/10 verdunner.

(20 µl serum + 180 µl verdunner.)

Voorbereiding van enzymconjugaat

Bereid het enzymconjugaat voor door verdunning van enzymconjugaat 11X, (1+10) in enzymconjugatiebuffer.

Opmerking: Conjugatievolumes worden bij voorkeur afgesteld door alles in één keer te verdunnen. Met andere woorden, giet de gehele buffer in de conjugatieampul.

Rustig mengen. Verdund conjugaat gedurende maximaal vier weken bewaren op 2-8°C.

Of bereid het benodigde volume conform onderstaande tabel. Rustig mengen.

Aantal strips	Enzym Conjugaat 11X	Conjugatie- buffer
4 strips	350 µl	3.5 ml
6 strips	500 µl	5.0 ml
12 strips	1 ampul	1 ampul

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

- Voor diagnostisch *in vitro* gebruik. Niet voor inwendig of uitwendig gebruik voor mensen en dieren.
- De inhoud van deze kit en de restanten ervan mogen onder geen voorwaarde in contact komen met herkauwend vee of varkens.

Deze kit bevat reagentia die infectueus kunnen zijn!

Deze kit bevat reagentia die van bestanddelen van menselijk bloed afkomstig zijn. Het bronmateriaal is getest door middel van immunoanalyse voor hepatitis B surface antigen en voor antistoffen voor HIV virus en negatief bevonden. Niettemin dienen alle aanbevolen voorzorgsmaatregelen voor de hantering van bloedderivaten in acht te worden genomen. Wij verwijzen hiervoor naar de HHS Publicatie nr. (CDC) 88-8395 of gelijkwaardige plaatselijke/nationale richtlijnen ten aanzien van veiligheidsprocedures voor laboratoria.

De stopoplossing bestaat uit een verdunde zwavelzuuroplossing. Vermijd blootstelling aan basen, metalen of andere samenstellingen die met zuren kunnen reageren. Zwavelzuur is giftig en corrosief en kan bij opname door de mond toxisch zijn. Om chemische verbranding te voorkomen contact met huid en ogen vermijden.

PROCEDURE

Parameters van de procedure

Volumes per well:

Monster	25 µl
Conjugaat	100 µl
Enzymsubstraat	200 µl
Stopoplossing	50 µl

Incubatietijd en temperatuur:

1 ^o incubatie	120 min. op schudapparatuur op kamertemperatuur, 20-28 °C, (RT)
2 ^o incubatie	15 min. op RT

Vereist materiaal, maar niet geleverd

- 25 µl micropipette met wegwerppunten
- 50 µl, 100 µl en 200 µl herhaalpipetten
- 1000 ml bekersglas
- Gedistilleerd water
- EIA plaatlezer met 450 nm filter
- Schudapparatuur
- Wasinstallatie voor microtitratieplaten

Referentiemateriaal

COMP Kalibratoren zijn gekalibreerd ten opzichte van een interne standaard, gecorrleerd aan de COMP inhibitie analyse, beschreven door Saxne en Heinegård in *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood*. Gepubliceerd in het British Journal of Rheumatology vol. 31 pp 583-591 (1992).

Interferentie

Er zijn componenten aan reagentia in de kit toegevoegd teneinde interferentie van muis- en RF-antistoffen die aanwezig zijn in de patiëntsera te voorkomen.

Testprocedure

Bereid een kalibratiecurve voor elke analysereeks. Alle reagentia en monsters dienen voor gebruik op kamertemperatuur te worden gebracht. Controles moeten worden behandeld als monsters. Wij raden u aan elke determinatie voor kalibratoren en onbekenden in tweevoud uit te voeren.

Toevoegen aan anti-COMP wells

- | | |
|--|--------|
| 1. Kalibratoren | 25 µl |
| 2. Verdunde controles en verdunde monsters | 25 µl |
| 3. Enzymconjugaat | 100 µl |
| 4. Incuberend op schudinstallatie en gedurende 2 uur flink schudden (bijv. 250 rpm, Ø 16mm) op kamertemperatuur op setting. | |
| 5. 6 keer spoelen met automatische wasser of:
het reactievolume opzuigen. Voeg 350 µl wasoplossing toe aan elke well.
Helemaal opzuigen. 5 keer herhalen.
Na de laatste spoeling de plaat omkeren en stevig tegen absorberend papier slaan. | |
| 6. Voeg 200 µl enzymsubstraat (TMB) toe | |

-
7. Incuberen gedurende 15 minuten
 8. Voeg 50 µl stopoplossing toe.
 9. Zet de plaat gedurende 5 seconden op de schudinstallatie om de menging van substraat en stopoplossing te waarborgen.
-
10. Meet de absorptie bij 450 nm en evalueer het resultaat.

Kwaliteitscontrole

- De absorptie van de laagste COMP ELISA kalibrator moet groter zijn dan de absorptie van de COMP ELISA monsterbuffer.
- De COMP ELISA Controle 1 en 2 concentraties moeten binnen het bereik van de op het etiket aangegeven waarden liggen.

Voor elke partij controles zijn de concentraties COMP gedetermineerd door gebruik van AnaMar COMP ELISA. De gemiddelde waarde en de standaardafwijking worden vermeld op de respectievelijke ampuletiketten. Elke gemiddelde waarde is gebaseerd op zes herhalingen in zes opeenvolgende reeksen.

Zoals bij alle immunoanalyses zullen de resultaten worden beïnvloed door testprocedures en uitrusting zoals door verschillende laboratoria wordt gebruikt. Zodoende wordt aanbevolen dat elk laboratorium haar eigen gemiddelde waarden en acceptatiecriteria vaststelt (bijv. 2 S.D. of 3 S.D.). Een reeks van ± 2 S.D. zou 95% van de enkelvoudige determinaties in een gegevensset met normale verdeling moeten omvatten.

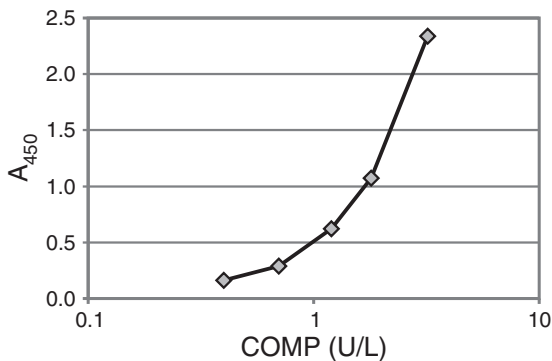
Voorbeeld van een werkblad

Wells	Identiteit
1A-B	Monsterbuffer
1C-D	Kalibrator 0.4 U/L*
1E-F	Kalibrator 0.7 U/L*
1G-H	Kalibrator 1.2 U/L*
2A-B	Kalibrator 1.8 U/L*
2C-D	Kalibrator 3.2 U/L*
2E-F	Controle 1
2G-H	Controle 2
3A-B	Onbekende 1

*Concentratie aangegeven op ampuletiket.

Kalibratiecurve

Hieronder wordt een kenmerkende kalibratiecurve getoond. Gebruik deze curve niet om feitelijke analyseresultaten te bepalen.



BEREKENING VAN RESULTATEN

Computerberekening

Er kan een computergestuurde datareductie van absorptie voor de kalibratoren versus de concentratie worden uitgevoerd door gebruik te maken van kubische spline-regressie of vierparameter-regressie teneinde de concentratie van COMP te verkrijgen. Vermenigvuldig de concentratie van de onbekende monsters met de verdunningsfactor (bijv. x 10).

Handmatige berekening

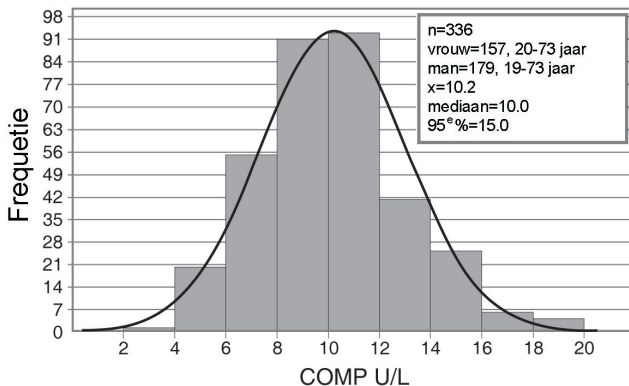
1. Breng de verkregen absorptiewaarden voor de kalibratoren ten opzichte van de COMP concentratie in kaart op log-log of lin-log papier en construeer een kalibratiecurve.
2. Lees de concentratie van de onbekende monsters van de kalibratiecurve af.
3. Vermenigvuldig de resultaten met de oplossingsfactor (x10).

VERWACHTE WAARDEN

Verwachte waarden in bloeddonors

Het behoort tot de normale gang van zaken dat elk laboratorium haar eigen te verwachten resultatenreeks vaststelt. Onderstaande resultaten kunnen dienst doen als richtsnoer totdat het laboratorium zelf voldoende gegevens heeft verzameld.

Alle monsters waren serummonsters, verkregen van bloeddonors in Zweden.



COMP in vroege en late RA

In een studie van 183 patiënten lijdend aan reumatoïde artritis was de concentratie COMP bij inclusie gerelateerd aan het risico van omvangrijke aantasting van kleine gewrichten na 5 jaar. De waarschijnlijkheidsratio per COMP unit in serum was 1,21 (betrouwbaarheidsinterval (CI) 1,07-1,36, $p < 0,002$). Deze data werden gebruikt om het relatieve risico van het ontwikkelen van de aantasting van gewrichten boven het 75^e percentiel (Larsen Score > 59 van 200) na 5 jaar (17) te schatten. Andere data, gepubliceerd door Skoumal M *et al.*, geven aan dat deze relatie tot de aantasting van kleine gewrichten ook zichtbaar is bij patiënten met een al lang bestaande ziekte (18).

Interpretatie

De volgende richtlijnen kunnen gebruikt worden ter bepaling van de gestadige omzetting van kraakbeen en het risico van de aantasting van gewrichten in de toekomst.

- < 12 U/L **Geringer risico van agressieve aantasting van gewrichten***
- 12-15 U/L **Toenemend risico van agressieve aantasting van gewrichten***
- > 15 U/L **Hoog risico van agressieve aantasting van gewrichten***

* Een verhoogd niveau van ESR vergroot verder de kans op agressieve aantasting van gewrichten

RESULTAATKARAKTERISTIEKEN

Detectielimiet⁽¹⁾

De detectielimiet is <0.1 U/L.

Parallellisme⁽¹⁾

Serummonsters werden 10, 20 en 40 keer opgelost door gebruik van de monsterverdunner. De waargenomen Verkregen/Verwachte waarden voor 1/20 en 1/40 lagen binnen een bereik van 93-116%.

Hook-effect⁽¹⁾

Monsters opgelost in 1/10 kunnen een concentratie bereiken tot minstens 200 U/l zonder onjuiste lage concentraties.

Nauwkeurigheid⁽¹⁾

Elk monster werd geanalyseerd in 4 herhalingen tijdens zes verschillende gelegenheden.

Monster	Gem. waarde U/L	Variatiecoëfficiënt		
		binnen analyse %	tussen analyse %	totaal analyse %
1	6,9	3,0	1,8	3,5
2	13,1	1,9	2,7	3,3
3	18,0	1,7	4,2	4,5

Notities

⁽¹⁾Studies uitgevoerd bij AnaMar Medical, Uppsala, Zweden

PROCEDUREBEPERKINGEN

Een definitieve klinische diagnose dient niet op slechts één enkele diagnosemethode te zijn gebaseerd, maar moet door de arts worden gedaan nadat alle klinische en laboratoriumonderzoekingen zijn geëvalueerd.

GARANTIE

De hier getoonde resultaatgegevens zijn verkregen met behulp van de aangegeven en aanbevolen procedure. Enige wijziging of modificatie in de procedure, welke niet door AnaMar Medical zijn aanbevolen, kunnen het resultaat beïnvloeden, zodat AnaMar Medical afstand doet van alle uitgedrukte garanties, impliciet of statutair, hierbij inbegrepen de impliciete garantie van verkoopbaarheid en gebruiksdeugdelijkheid.

In het gegeven geval kunnen AnaMar en haar erkende distributeurs niet aansprakelijk worden gesteld voor directe of gevolgschade.

VERKLARING VAN DE OP ETIKETTEN GEBRUIKTE SYMBOLEN



n=96

Reagentia voor 96 bepalingen



Vervaldatum



2-8°C

Bewaren bij 2-8°C



Partij nr.



Voor diagnostisch in vitro gebruik



Vervaardigd door

APLICAÇÃO

O COMP ELISA é um ensaio de imunoabsorção enzimática para a determinação da Proteína Oligomérica da Matriz Cartilaginosa (COMP) no soro humano. A presença de níveis elevados, quando considerada em conjunto com outras descobertas laboratoriais e clínicas, é uma ajuda na identificação da destruição agressiva dos tecidos das rótulas em doenças com a artrite reumatóide (AR).

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A COMP foi descrita pela primeira vez em 1992 pelo grupo de investigação do Dick Heinegård (1), da Universidade de Lund, na Suécia. A molécula é uma proteína pentamérica, constituída por cinco sub-unidades dissulfídicas idênticas (2), com um total de massa molecular de 434 kDa (3). A COMP foi descrita pela primeira vez na cartilagem (1), mas, recentemente, também foi encontrada nos tendões (4) e nas membranas sinoviais (5). Não foi possível detectar a COMP através de meios de culturas a partir de outros tecidos de ligações, tais como tecidos cutâneos ou pulmonares (6).

Está bastante documentado (7,8,9,10) que quando a matriz cartilaginosa articular é degradada por um processo de doença, são produzidos fragmentos de proteínas, que se difundem no líquido da rótula. Algumas destas proteínas, tais como a COMP, aparecem subseqüentemente no fluxo sanguíneo e podem ser utilizadas para monitorizar o avanço da degradação da cartilagem em doenças inflamatórias da rótula, tais como a artrite reumatóide (8,11) e a osteoartrite (12,13,14). Foi apresentada uma relação quantitativa entre as concentrações de COMP na degradação do soro e da cartilagem (10), utilizando alterações radiográficas como um ponto final clínico suplementar. Esta relação foi ainda comprovada em experiências de indução de artrite em modelos animais, em que o nível de soro da COMP estava altamente correlacionado com a gravidade da artrite (15,16) e também com os resultados da rótula clínica e os sinais histopatológicos da erosão da cartilagem (16).

REGRAS DO PROCEDIMENTO

O COMP ELISA é um imunoensaio de enzimas em dois locais de fase sólida. Baseia-se directamente na técnica de sanduíche, na qual dois anticorpos monoclonais são direccionados contra determinantes antigénicos na molécula da COMP. Durante a incubação, a COMP presente na amostra reage com os anticorpos da peroxidase-conjugada anti-COMP e os anticorpos anti-COMP ligam-se ao poço da microtitulação. Um procedimento de lavagem da amostra remove os anticorpos rotulados com enzima não ligados. O conjugado ligado é detectado por uma reacção com tetrametilbenzidina 3,3',5,5' (TMB). Esta reacção é interrompida pela adição de ácido para proporcionar um ponto final colorimétrico, que é lido espectrofotometricamente.

REAGENTES

Cada kit COMP ELISA contém reagentes para 96 poços, o que é suficiente para uma curva de calibração, um ensaio a branco, dois controles e 40 amostras em duplicado. Para séries de ensaios maiores, utilize reagentes agrupados de embalagens que apresentem números de lote idênticos. A data de validade do kit completo é indicada na etiqueta exterior. A temperatura de armazenamento recomendada é entre 2 e 8°C.

Placa revestida com anti-COMP (Anticorpos monoclonais de ratinho)	1 placa 96 poços 8 tiras de poços	Pronto a utilizar <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i> <i>Para tiras de microtitulação não utilizadas, feche novamente a embalagem e armazene entre 2 e 8°C durante dois meses.</i>
Calibradores (COMP humana em tampão) Cocentração indicada no rótulo do frasco	5 frascos 1.0 ml	Liofilizado <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i> Junte 1,0 ml de água destilada por frasco.* <i>Calibrador reconstituído: armazene entre 2 e 8°C durante 4 semanas ou a -20 °C até à data de validade.</i>
Tampão da amostra	2 frascos 7.5 ml	Pronto a utilizar <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i>
Conjugado da enzima 11x Peroxidase-anti-COMP (Anticorpos monoclonais de ratinho, ~ 10 µg/mL)	1 frasco 1.3 ml	Pronto a utilizar <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i> Preparação, ver tabela. Não congele!
Tampão do conjugado Codificação de cor azul	1 frasco 13 ml	Pronto a utilizar <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i>
Pastilhas de lavagem	2 pastilhas	Dissolva cada pastilha em 500 ml de água destilada. <i>Guarde a solução a 2-8 °C. Utilizar no prazo de 4 semanas.</i>
Substrato da enzima (TMB)	1 frasco 22 ml	Pronto a utilizar <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i> Sensível à luz!

Solução de paragem** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 frasco	7 ml	Pronto a utilizar <i>Armazenar entre 2 e 8°C até à data de validade</i>
Controlo 1 (COMP humana em tampão)	1 frasco	0.5 ml	Liofilizado Junte 0,5 mL de água destilada . <i>Controlo reconstituído: armazene entre 2 e 8°C durante 4 semanas ou a -20 °C até à data de validade.</i>
Controlo 1 (COMP humana em tampão)	1 frasco	0.5 ml	Liofilizado Junte 0,5 mL de água destilada . <i>Controlo reconstituído: armazene entre 2 e 8°C durante 4 semanas ou a -20 °C até à data de validade.</i>

***Nota!** Certifique-se de que os reagentes liofilizados são diluídos correctamente.

****Folha de Dados de Segurança do Material disponível a pedido.**

PREPARAÇÃO E MANUSEAMENTO DAS AMOSTRAS E DO CONJUGADO DA ENZIMA

Amostras

O sangue deve ser colhido por punção venosa, deixar coagular e o soro deve ser separado por centrifugação. As amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente (apenas para efeitos de transporte), a uma temperatura entre 2 e 8°C se ensaiadas num período de uma semana após a colheita, ou a uma temperatura de -20°C para ensaios posteriores.

Contacte a AnaMar para obter conselhos relativamente à medição da COMP em outros fluidos corporais.

O plasma em heparina também pode ser utilizado.

Nota! O plasma EDTA e o plasma com citrato não podem ser utilizados.

Preparação de amostras e controlos

As amostras e os controlos devem ser diluídos em 1/10 de tampão da amostra.

(20 µL de soro+ 180 µL de tampão da amostra.)

Preparação do conjugado da enzima

Prepare o Conjugado da Enzima através da diluição do Conjugado da Enzima 11X, (1+10) em tampão do Conjugado da Enzima.

Nota: Os volumes do conjugado são preferivelmente ajustados através da diluição em conjunto e em simultâneo. Por outras palavras, verta todo o tampão no frasco do conjugado.

Misture suavemente. Armazene o conjugado diluído a uma temperatura entre 2 e 8°C até quatro semanas.

Ou prepare o volume necessário, de acordo com o quadro seguinte. Misture suavemente.

Número de tiras	Enzima Conjugado 11X	Conjugado tampão
4 tiras	350 µl	3.5 ml
6 tiras	500 µl	5.0 ml
12 tiras	1 frasco	1 frasco

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para uso de diagnóstico *In Vitro*. Não se destina a utilização interna ou externa em humanos ou animais.
- Os conteúdos deste kit e os respectivos resíduos não devem entrar em contacto com animais ruminantes ou suídeos.

Este kit contém reagentes que podem ser infecciosos!

Este kit contém reagentes fabricados a partir de componentes sanguíneos humanos. O material de origem foi testado por imunoensaio contra o antígeno de superfície da Hepatite B e anticorpos do vírus HIV e foi considerado negativo. Contudo, devem ser observadas todas as precauções para o manuseamento de derivados sanguíneos. Consulte a Publicação da HHS n.º (CDC) 88-8395 ou as directrizes correspondentes locais/nacionais acerca dos procedimentos laboratoriais de segurança.

A Solução de Paragem é composta por uma solução de ácido sulfúrico. Evite a exposição a bases, metais ou outros compostos que possam reagir com os ácidos. O ácido sulfúrico é venenoso e corrosivo e pode ser tóxico se ingerido. Para evitar queimaduras químicas, evite o contacto com os olhos e com a pele.

PROCEDIMENTO

Parâmetros do Procedimento

Volumes por poço:

Amostra	25 µL
Conjugado	100 µL
Substrato da enzima	200 µL
Solução de paragem	50 µL

Tempo e Temperatura da Incubação:

- | | |
|---------------|--|
| 1.ª Incubação | 120 min. num agitador de placas à temperatura ambiente, 20-28 °C, (RT) |
| 2.ª Incubação | 15 min. a RT |

Materiais requeridos mas não fornecidos

- Micropipetas de 25 µL com pontas descartáveis
- Pipetas de repetição de 50 µL, 100 µL e 200 µL
- Copo de 1000 mL
- Água destilada
- Leitor de placas EIA com filtro de 450 nm
- Agitador de placas
- Dispositivo de lavagem para placas de microtitulação

Material de Referência

Os Calibradores COMP são calibrados de acordo com uma norma interna, correlacionada com o ensaio de inibição da COMP, descrito por Saxne e Heinegård em *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood*. Publicado no Jornal Britânico de Reumatologia, vol. 31 páginas 583-591 (1992).

Interferência

Foram adicionados componentes aos reagentes no kit para evitar a interferência de anticorpos dos ratos e RF no soro humano a testar.

Procedimento do Teste

Prepare uma curva do calibrador para cada teste. Todos os reagentes e amostras deverão estar à temperatura ambiente antes da sua utilização. Os controlos deverão ser tratados como amostras. Recomendamos que cada determinação para os calibradores e valores desconhecidos seja efectuada em duplicado.

Adição a poços de anti-COMP

- | | |
|--|--------|
| 1. Calibradores | 25 µL |
| 2. Controlos diluídos e amostras diluídas | 25 µL |
| 3. Conjugado da enzima | 100 µL |
| 4. Incube num misturador e agite intensamente (por ex., 250 rpm Ø 16 mm) durante 2 horas à temperatura ambiente. | |
| 5. Lave 6 vezes com o lavador automático, ou: | |

Aspire o volume da reacção. Junte 350 µL de solução de lavagem a cada poço.

Aspire completamente. Repita 5 vezes.

Depois da última lavagem, inverta e pressione a placa firmemente contra papel absorvente.

6. Junte 200 µL de substrato da enzima (TMB)
7. Incube durante 15 minutos
8. Junte 50 µL de solução de paragem.
9. Coloque a placa no misturador durante aproximadamente 5 segundos para se certificar de que mistura o substrato e a solução de paragem.
10. Meça a absorvência a 450 nm e avalie.

Controlo de Qualidade

- A absorvência do inferior Calibrador COMP ELISA deve ser superior à absorvência do tampão da amostra COMP ELISA.
- A concentração dos Controlos I e II COMP ELISA deve encontrar-se dentro do intervalo de valores indicado nas respectivas etiquetas.

Para cada lote, as concentrações de COMP foram determinadas utilizando o COMP ELISA da AnaMar. O valor médio e o desvio médio estão indicados na etiqueta dos respectivos frascos. Cada valor médio baseia-se em seis replicados em seis execuções consecutivas.

Tal como todos os imunoensaios, os resultados são afectados pelos procedimentos de teste e pelo equipamento utilizado por diferentes laboratórios. Assim, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores médios e critérios de aceitação (p. ex. 2 S.D. ou 3 S.D.). Um intervalo de ± 2 S.D. deve incluir 95% das determinações individuais em conjuntos de dados com distribuição normal.

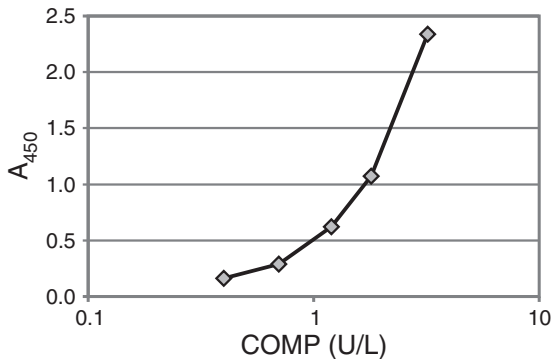
Exemplo de folha de trabalho

Poços	Identidade
1A-B	Tampão da amostra
1C-D	Calibradores 0,4 U/L*
1E-F	Calibradores 0,7 U/L*
1G-H	Calibradores 1,2 U/L*
2A-B	Calibradores 1,8 U/L*
2C-D	Calibradores 3,2 U/L*
2E-F	Controlo 1
2G-H	Controlo 2
3A-B	Desconhecido1

*Concentração indicada no rótulo do frasco.

Curva de calibração

Uma curva de calibração típica é mostrada em baixo. Não utilize esta curva para determinar os resultados actuais do ensaio.



CÁLCULO DOS RESULTADOS

Cálculo computadorizado

A redução de valores de absorvência computadorizados para os calibradores versus a concentração utilizando a regressão de veio cúbico ou quatro parâmetros de regressão podem ser efectuadas para obter uma concentração de COMP. Multiplique a concentração de amostras desconhecidas com o factor de diluição (por exemplo, x10).

Cálculo manual

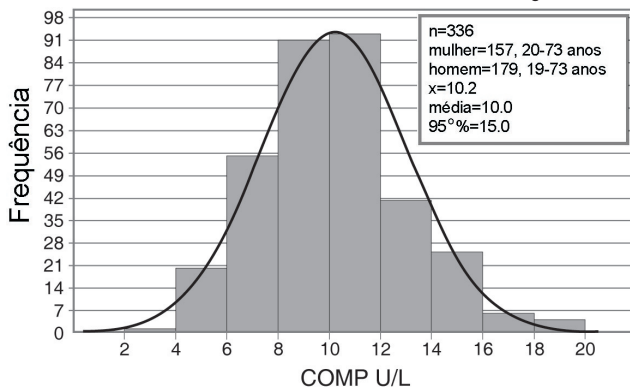
1. Registe os valores de absorvência obtidos para os calibradores contra a concentração de COMP numa folha de registo e construa uma curva de calibração.
2. Leia a concentração das amostras desconhecidas a partir da curva de calibração.
3. Multiplique os resultados pelo factor de diluição (x10).

VALORES ESPERADOS

Valores esperados em dadores de sangue

Uma boa prática dita que cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de valores esperados. Os resultados que se seguem poderão servir de guia até que o laboratório tenha recolhido dados suficientes.

as amostras eram amostras de soro recolhidas de dadores de sangue na Suécia.



COMP em RA precoce e tardio

Num estudo de 183 doentes de artrite reumatóide, a concentração de COMP na inclusão foi relacionada com o risco de uma destruição da rótula pequena extensiva

ao fim de 5 anos. A relação por unidade de COMP no soro foi de 1.21 (intervalo de confiança (CI) 1.07-1.36, $p < 0.002$). Estes dados foram utilizados para realizar uma estimativa do valor previsível positivo (PPV) e o risco relativo de desenvolvimento de uma destruição da rótula acima dos 75% (pontuação Larsen > 59 de 200) ao fim de 5 anos (17). Outros dados publicado por Skoumal M *et al.* indicam que esta relação com a destruição da rótula também é identificada em doentes com doenças prolongadas (18).

Interpretação

As directrizes que se seguem podem ser utilizadas para avaliar a mudança da cartilagem e o risco de destruição da rótula no futuro.

< 12 U/L **Risco decrescente de destruição da rótula agressiva***

12-15 U/L **Risco crescente de destruição agressiva da rótula***

> 15 U/L **Risco elevado de destruição agressiva da rótula***

Risco aumentado de destruição agressiva da rótula*

* Um nível elevado de ESR aumenta o risco de destruição agressiva da rótula

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de detecção⁽¹⁾

O limite de detecção é de <0.1 U/L.

Paralelismo⁽¹⁾

As amostras de soro foram diluídas 10, 20 e 40 vezes, utilizando o diluente da amostra. Os valores obtidos/esperados para 1/20 e 1/40 estavam no intervalo de 93-116%.

Efeito Hook⁽¹⁾

As amostras diluídas em 1/10 podem ter uma concentração até 200 U/L sem darem falsas concentrações baixas.

Precisão⁽¹⁾

Cada amostra foi analisada em 4 replicados em seis ocasiões diferentes.

Amostra	Valor médio U/L	Coeficiente de variação		
		dentro de ensaio %	entre ensaio %	total ensaio %
1	6.9	3.0	1.8	3.5
2	13.1	1.9	2.7	3.3
3	18.0	1.7	4.2	4.5

Notas

⁽¹⁾Estudos realizados em AnaMar Medical, Uppsala, Suécia

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Um diagnóstico clínico definitivo não deverá ser baseado num único método de diagnóstico, mas só deverá ser emitido por um médico após todas as descobertas clínicas e laboratoriais terem sido avaliadas.

GARANTIA

O desempenho dos dados aqui apresentados foi obtido utilizando o procedimento indicado recomendado. Qualquer alteração ou modificação no procedimento não recomendada pela AnaMar Medical poderá afectar os resultados, caso em que a AnaMar Medical recusa qualquer responsabilidade relativamente a garantias expressas, implícitas ou obrigatórias, incluindo a garantia implícita comercial e de adequação a um determinado fim.

Nessa eventualidade, a AnaMar Medical e seus distribuidores autorizados não serão responsáveis por quaisquer danos, indirectos ou directos.

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NAS ETIQUETAS



n=96

Reagentes par 96 determinações



Data de validade



2-8°C

Armazenar entre 2 e 8°C



Número do lote



Para uso de diagnóstico *in vitro*



Fabricado por

ANVÄNDNINGSMRÅDE

COMP ELISA är en kvantitativ enzym-länkad immunsorbent metod för bestämning av Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) i humant serum. Förekomst av förhöjda nivåer, tillsammans med andra laboratorie- och kliniska fynd, är till hjälp vid identifiering av aggressiv leddestruktion vid sjukdomar som reumatoid artrit (RA).

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTEN

COMP beskrevs första gången 1992 av en forskargrupp ledd av professor Dick Heinegård (1) vid Lunds universitet. Molekylen är ett pentameriskt protein med fem identiska subenheter förenade med disulfidbrygga (2) och har en total molekylvikt på 434 kDa (3). COMP kartlades först i brosk (1), men har nyligen även återfunnits i senor (4) samt i synovialmembran (5). Det har inte varit möjligt att spåra COMP i odlingssubstrat från annan bindväv såsom hud eller lungvävnad (6).

Det är väl dokumenterat (7,8,9,10) att när ledbroskmatrix bryts ned i en sjukdomsprocess, produceras proteinfragment som diffunderar ut i ledvätskan. Vissa av dessa proteiner, såsom COMP, visar sig sedan i blodet och kan användas för att kartlägga broskförstöringen vid inflammatoriska ledsjukdomar som reumatoid artrit (8,11) och osteoartrit (12,13,14). Genom att använda röntgenförändringar som klinisk surrogatslutpunkt har man påvisat en kvantitativ relation mellan COMP-koncentrationen i serum och broskförstöring (10). Denna har ytterligare styrkts genom experimentellt framkallad artrit i djurmodeller där COMP-serumnivån korrelerade starkt med artritens svårighetsgrad (15,16) och även med klinisk "scoring" av leder och histopatologiska tecken på brosknedbrytning (16).

SAMMANFATTNING AV METODEN

COMP ELISA är en immunologisk bestämningsmetod som utnyttjar två antikroppar varav den ena är kopplad till fast fas. Den baseras på den direkta sandwich-teknik där två monoklonala antikroppar riktas mot separata antigen determinanter på COMP-molekylen. Under inkubationen reagerar COMP i provet med peroxidaskonjugerade anti-COMP antikroppar och anti-COMP antikroppar bundna till mikrotiterbrunnen. Ett enkelt tvättsteg tar bort obundna enzym-märkta antikroppar. Det bundna konjugatet detekteras genom en reaktion med 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Reaktionen avbryts genom att syra tillsätts. Det ger en kolorimetrisk slutpunkt som avläses spektrofotometriskt.

REAGENSER

Varje COMP ELISA-kit innehåller reagenser för 96 bestämningar vilket räcker till en kalibreringskurva, en blank, två kontroller och 40 prover i duplikat. För större analysserier, använd sammanslagna reagenser från förpackningar med samma tillverkningsnummer. Utgångsdatum för hela kitet anges på den yttre etiketten. Rekommenderad förvaringstemperatur är 2-8°C.

Anti-COMP-coatad platta (Monoklonala antikroppar från mus)	1 platta 96 brunnar 8-strips	Färdig att användas Förvaras i 2-8°C fram till utgångsdatum För oanvända mikrotiterstrips återförslut påsen och förvara i 2-8°C i två månader.
Kalibratorer (humant COMP i buffertlösning) Koncentration angiven på flaskans etikett	5 flaskor 1,0 ml	Frystorkade Förvara i 2-8°C fram till utgångsdatum Tillsätt 1,0 ml destillerat vatten per flaska.* Rekonstituerad kalibrator: förvaras i 2-8°C i 4 veckor eller i -20°C fram till utgångsdatum.
Provbuffert	2 flaskor 7.5 ml	Färdig att användas Förvaras i 2-8°C fram till utgångsdatum
Enzymkonjugat 11x Peroxidas-anti-COMP (Monoklonala antikroppar från mus, ~ 10 µg/ml)	1 flaska 1.3 ml	Koncentrat Förvaras i 2-8°C fram till utgångsdatum För beredning, se tabell. Frys ej!
Konjugatbuffert Färgkod: blå	1 flaska 13 ml	Färdig att användas Förvaras i 2-8°C fram till utgångsdatum
Tvätttabletter	2 tabletter	Lös upp varje tablett i 500 ml destillerat vatten. Förvara lösningen i 2-8°C. Användes inom 4 veckor
Enzymsubstrat (TMB)	1 flaska 22 ml	Färdig att användas Förvaras i 2-8°C fram till utgångsdatum Ljuskänsligt!
Stopplösning**0.5 M H ₂ SO ₄	1 flaska 7 ml	Färdig att användas Förvaras i 2-8°C fram till utgångsdatum

Kontroll 1 (humant COMP i buffertlösning)	1 flaska	0.5 ml	Frystorkad Tillsätt 0,5 ml destillerat vatten.* <i>Rekonstituerad lösning: förvaras i 2-8°C i 4 veckor eller i -20°C fram till utgångsdatum</i>
Kontroll 2 (humant COMP i buffertlösning)	1 flaska	0.5 ml	Frystorkad Tillsätt 0,5 ml destillerat vatten.* <i>Rekonstituerad lösning: förvaras i 2-8°C i 4 veckor eller i -20°C fram till utgångsdatum</i>

*Obs! Det är viktigt att alla frystorkade reagens är ordenligt upplösta.

**Varuinformationsblad finns tillgängligt på begäran.

FRAMSTÄLLNING OCH HANTERING AV PROVER OCH ENZYMKONJUGAT

Prover

Blod bör samlas in genom venpunktion och tillåtas koagulera. Serum separeras genom centrifugering. Serum kan förvaras i rumstemperatur (endast vid frakt), i 2-8°C om bestämning sker inom en vecka från uppsamlingen, eller i -20°C vid senare analys.

Även heparinplasma kan användas.

Obs! EDTA-plasma och citratplasma kan inte användas.

Kontakta AnaMar för råd vid mätning av COMP i andra kroppsvätskor.

Framställning av prover och kontroller

Prover och kontroller spådes 1/10 i provbuffert.

(20 µl serum + 180 µl provbuffert)

Beredning av enzymkonjugat

Bered enzymkonjugat genom att spåda ut enzymkonjugat 11X, (1+10) i enzymkonjugatbuffert.

Obs: Mängden konjugat regleras bäst genom att spåda allt på en gång. Håll med andra ord all buffertlösning i konjugatflaskan.

Blanda försiktigt. Förvara utspädd konjugat i 2-8°C i upp till fyra veckor.

Eller bered den mängd som behövs enligt tabellen nedan. Blanda försiktigt.

Antal strips	Enzym-konjugat 11X	Konjugatbuffert
4 strips	350 µl	3,5 ml
6 strips	500 µl	5,0 ml
12 strips	1 flaska	1 flaska

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro*-diagnostik. Ej för in- eller utvärtes bruk hos människor eller djur.
- Innehållet i denna sats samt dess överblivna rester får inte komma i kontakt med idisslande djur eller svin.

Satsen innehåller reagenser som kan vara smittsamma!

Satsen innehåller reagenser som tillverkats av blodkomponenter från människa. Källmaterialet har testats genom en immunologisk bestämningmetod för hepatit B ytantigen och för antikroppar för HIV-virus och befunnits vara negativa. Oavsett detta bör alla rekommenderade försiktighetsåtgärder vidtagas vid hantering av blodderivat. Var vänlig tag del av HHS Publikation nr. (CDC) 88-8395 eller motsvarande lokala/nationella säkerhetsföreskrifter för laboratorier.

Stopplösningen består av utspädd svavelsyrelösning. Undvik kontakt med baser, metaller eller andra föreningar som kan reagera med syror. Svavelsyra är ett gift, det är frätande och kan vara giftigt vid förtäring. För att förebygga kemiska brännskador undvik kontakt med hud och ögon.

METOD

Parametrar

Mängd per brunn:

Prov	25 µl
Konjugat	100 µl
Enzymsubstrat	200 µl
Stopplösning	50 µl

Inkubationstid och -temperatur:

1:a inkubationen	120 min på en skak avsedd för plattor i rumstemperatur, 20-28 °C.
2:a inkubationen	15 min i rumstemperatur.

Rekommenderad utrustning som inte ingår:

- 25 µl mikropipetter med engångsspetsar
- 50 µl, 100 µl och 200 µl dospipetter
- 1000 ml bägare
- Destillerat vatten
- EIA-plattläsare med 450 nm filter
- Skak avsedd för mikrotiterplattor
- Tvättapparat för mikrotiterplattor

Referensmaterial

COMP-kalibratorer kalibreras gentemot företagets egen standard som korrelerats med en inhibitionsassay för COMP bestämning som beskrivits av Saxne och Heinegård i artikeln *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood* i British Journal of Rheumatology vol. 31 sid. 583-591 (1992).

Interferens

Komponenter har tillsatts reagenserna i kitet för att förhindra interferens från antikroppar mot mus och RF i patientens sera.

Testmetod

Förbered en kalibratorkurva för varje bestämningsomgång. Alla reagenser och prover skall ha rumstemperatur innan de används. Kontroller bör behandlas som prover. Vi rekommenderar att varje bestämning för kalibratorer och okända utförs i duplikat.

Tillsätt i anti-COMP-brunnar

1. Kalibratorer	25 µl
2. Utspädda kontroller och utspädda prover	25 µl
3. Enzymkonjugat	100 µl
4. Inkubera i rumstemperatur på en skak för plattor. Skaka kraftigt (t.ex. 250 rpm, Ø 16mm) under två timmar	
5. Tvätta 6 ggr i automattvätt, eller: Aspirera reaktionsvolymen. Tillsätt 350 µl tvättlösning i varje brunn. Aspirera torrt. Upprepa 5 ggr. Efter sista tvätten, vänd plattan och knacka den mot absorberande papper.	
6. Tillsätt 200 µl Enzymsubstrat (TMB)	
7. Inkubera 15 minuter	

-
8. Tillsätt 50 µl stopplösning
 9. Placera plattan på en skak för plattor i omkring 5 sekunder för att vara säker på att substrat och stopplösning blandas
-
10. Mät absorbans vid 450 nm och utvärdera

Kvalitetskontroll

- Absorbansen av den lägsta COMP ELISA kalibratoren bör vara större än absorbansen av COMP ELISA provbuffert. Koncentrationen för COMP ELISA
- Kontroll 1 och 2 bör ligga inom det intervall som anges på etiketten.

För varje tillverkning av kontroller har COMP-koncentrationerna bestämts genom att använda COMP ELISA från AnaMar. Medelvärde och standardavvikelsen anges på respektive flasketikett. Varje medelvärde baseras på sex replikat i sex på varandra följande omgångar.

Som vid alla immunologiska bestämningsmetoder påverkas resultaten av de provmetoder och den utrustning olika laboratorier använder. Det rekommenderas därför att varje laboratorium fastställer sina egna medelvärden och acceptanskriterier (t.ex. 2 eller 3 standardavvikelser). Ett standardavvikelseintervall på ± 2 bör omfatta 95 % av de enskilda bestämningarna i en datauppsättning med normal distribution.

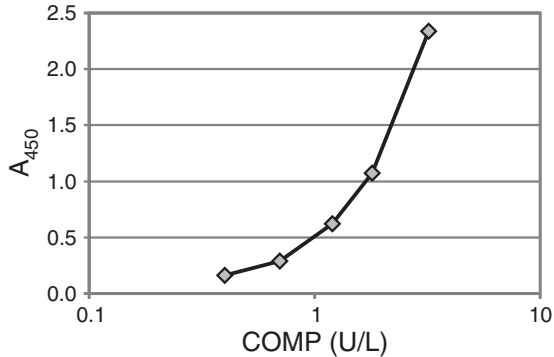
Exempel på arbetsblad

Brunnar	Identitet
1A-B	Provbuffert
1C-D	Kalibrator 0.4 U/L*
1E-F	Kalibrator 0.7 U/L*
1G-H	Kalibrator 1.2 U/L*
2A-B	Kalibrator 1.8 U/L*
2C-D	Kalibrator 3.2 U/L*
2E-F	Kontroll 1
2G-H	Kontroll 2
3A-B	Okänd 1

*Koncentration angiven på flaskans etikett.

Kalibreringskurva

En typisk kalibreringskurva visas nedan. Använd inte denna kurva för att fastställa själva testresultaten.



UTRÄKNING AV RESULTAT

Datoriserad beräkning

En datoriserad datareduktion av kalibratorernas absorbans som funktion av koncentrationen används genom att tillämpa kubisk spline eller fyrparametrisk regression. Multiplicera koncentrationen för de okända proven med spädningsfaktorn (X10).

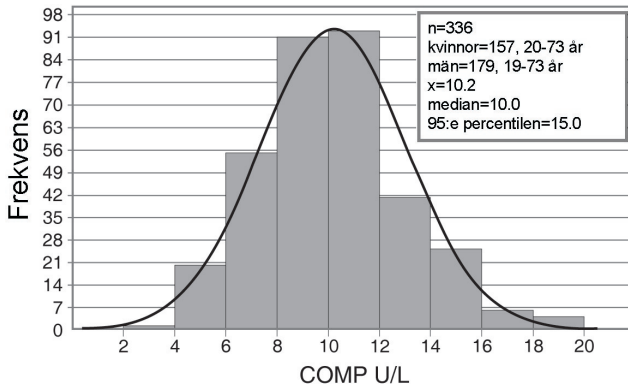
Manuell beräkning

1. Plotta de absorbansvärden som erhöles för kalibratorerna mot COMP-koncentrationen på ett lin-log-papper och konstruera en kalibreringskurva.
2. Avläs koncentrationen för de okända proven från kalibreringskurvan.
3. Multiplicera resultaten med spädningsfaktorn (X10).

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Förväntade värden hos bloddonatorer

God sed föreskriver att varje laboratorium fastställer sitt eget förväntade värdeintervall. Följande resultat kan fungera som vägledning fram till dess att laboratoriet samlat ihop tillräckliga egna data. Alla prover var serumprov som insamlades från bloddonatorer i Sverige.



COMP i tidig och framskriden RA

I en studie där 183 patienter med reumatisk artrit deltog relaterades COMP-koncentrationen vid inklusion till risken för betydande förstöring av småleder efter 5 år. Oddskvoten per COMP-enhet i serum var 1,21 (konfidenzintervall (KI) 1,07-1,36, $p < 0,002$). Dessa data användes för att värdera den relativa risken att utveckla ledförstöring ovan den 75:e percentilen (Larsen Score > 59 av 200) efter 5 år (17). Andra data, publicerade av Skoumal M et al., indikerar att denna relation till förstöring av småleder även kan ses hos patienter med långvarig sjukdom (18).

Tolkning

Följande riktlinjer kan användas för att utvärdera pågående broskomsättning och risk för ledförstöring i framtiden.

< 12 U/L **Lägre risk för aggressiv ledförstöring***

12-15 U/L **Ökad risk för aggressiv ledförstöring***

> 15 U/L **Hög risk för aggressiv ledförstöring***

*Förhöjd ESR ökade ytterligare risken att drabbas av aggressiv ledförstöring i RA (17).

PRESTANDA

Detektionsgräns⁽¹⁾

Detektionsgränsen är <0,1 U/L.

Parallellism⁽¹⁾

Serumproven späddes 10, 20 och 40 gånger med samma utspädningslösning. De observerade erhållna/förväntade värdena för 1/20 och 1/40 låg inom intervallet 93-116 %.

“Hook”- Effekt⁽¹⁾

Prov som spädes 1/10 kan ha en koncentration på upp till minst 200 U/L utan att ge felaktigt låga koncentrationer.

Precision⁽¹⁾

Varje prov analyserades i fyra replikat vid sex olika tillfällen.

Prov	Medelvärde U/L	Variationskoefficient		
		inom assay %	mellan assay %	total assay %
1	6,9	3,0	1,8	3,5
2	13,1	1,9	2,7	3,3
3	18,0	1,7	4,2	4,5

Noter

⁽¹⁾Studier utförda vid AnaMar Medical, Uppsala, Sweden

METODENS BEGRÄNSNINGAR

En definitiv klinisk diagnos bör inte baseras på en enstaka diagnostisk metod, utan bör endast ställas av läkaren när alla kliniska och laboratoriska fynd har utvärderats.

GARANTI

De data som presenterats här erhöles genom att man använde sig av den föreskrivna metoden. Alla förändringar eller modifieringar av metoden som inte rekommenderas av AnaMar Medical kan påverka resultaten, i vilket fall AnaMar Medical avsäger sig alla utfärdade garantier, uttryckliga eller underförstådda, inklusive den underförstådda garantin om säljbarhet och ändamålsenlighet. I sådana fall ansvarar AnaMar Medical eller dess auktoriserade distributörer inte för följd- eller indirekt skada.

FÖRKLARING AV ETIKETTSYMBOLER



n=96

Reagenser för 96 bestämningar



Utgångsdatum



2-8°C

Förvaras i 2-8°C



Tillverkningsnummer



Endast för in vitro-diagnostik



Tillverkad av

TILSIGTET ANVENDELSE

COMP ELISA er en kvantitativ enzymimmunanalyse til bestemmelse af Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) i human serum. Forekomsten af forhøjede niveauer er – når det ses i kombination med andre laboratoriefund og kliniske fund – en hjælp i påvisningen af aggressiv destruktion af ledvæv i forbindelse med sygdomme som reumatoid arthritis (RA).

RESUMÉ OG BESKRIVELSE AF TESTEN

COMP blev beskrevet første gang i 1992 af en forskningsgruppe under professor Dick Heinegård (1), Lund Universitet i Sverige. Molekylet er et pentamerisk protein med fem identiske disulfid-koblede underenheder (2) med en samlet molekylvægt på 434 kd (3). COMP blev først beskrevet i cartilago (1), men er for nylig også fundet i sener (4) og synovialmembraner (5). Det har ikke været muligt at påvise COMP i vækstmedium fra andet bindevæv, såsom hud- eller lungevæv (6).

Det er veldokumenteret (7,8,9,10), at når ledbruskmatrix nedbrydes som følge af en sygdoms progression, produceres proteinfragmenter, som diffunderer ud i ledvæsken. Nogle af disse proteiner, såsom COMP, dukker efterfølgende op i blodbanen og kan anvendes til monitorering af udviklingen af brusknedbrydning i forbindelse med inflammatoriske ledsygdomme som reumatoid arthritis (8,11) og osteoarthritis (12,13,14). Et kvantitativt forhold mellem koncentrationerne af COMP i serum og brusknedbrydning (10) er påvist med anvendelse af radiografiske forandringer som et klinisk surrogat-slutpunkt. Dette er blevet yderligere bevist i eksperimentelt induceret arthritis i dyremodeller, hvor niveauet af COMP i serum var stærkt forbundet med sværhedsgraden af arthritis (15,16) og desuden til den kliniske led-score og histopatologiske tegn på erosion i cartilago (16).

PROCEDURENS PRINCIPPER

COMP ELISA er en fast fase enzymimmunanalyse. Den er baseret på den direkte sandwich-teknik, hvor to monoklonale antistoffer rettes mod separate antigene determinanter på COMP-molekylet. Under inkubationen reagerer COMP i prøven med peroxidase-konjugerede anti-COMP-antistoffer samt anti-COMP-antistoffer, der er bundet til mikrotitreringsbrønden. Med et enkelt udskylningstrin fjernes ubundet, enzym-mærket antistof. Det bundne konjugat påvises med en reaktion med 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Denne reaktion standses ved at tilsætte syre for at få et kolorimetrisk slutpunkt, som aflæses spektrofotometrisk.

REAGENSER

Hvert COMP ELISA-sæt indeholder reagenser til 96 brønde, hvilket er tilstrækkeligt til 1 kalibratorcurve, et blindforsøg, to kontroller og 40 prøver i to eksemplarer. Til større rækker analyser anvendes sammenlagte reagenser fra pakninger med identiske lot-numre. Udløbsdatoen for hele sættet er angivet på den yvendige mærkat. Den anbefalede opbevaringstemperatur er 2-8°C.

Anti-COMP-belagt plade (monoklonale antistoffer fra mus)	1 plade 96 brønde 8 brøndstrimler	Klar til brug Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen Hvis der er ubrugte mikrotitreringsstrimler tilbage, lukkes posen igen og opbevares ved 2-8°C i to måneder
Kalibratører (human COMP i buffer) Koncentration oplyst på hætteglassets etiket	5 hætteglas 1,0 ml	Lyofiliserede Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen Tilsæt 1,0 ml destilleret vand pr. hætteglas* Rekonstitueret kalibrator: opbevares ved 2-8°C i 4 uger eller ved -20°C indtil udløbsdatoen
Prøvebuffer	2 hætteglas 7.5 ml	Klar til brug Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen
Enzymkonjugat 11x Peroxidase-anti-COMP (monoklonale antistoffer fra mus, ~ 10 µg/ml)	1 flaske 1.3 ml	Koncentrat Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen Præparation: se tabel. Må ikke nedfryses!
Konjugatbuffer Blå farvekode	1 hætteglas 13 ml	Klar til brug Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen
Tvåttabletter	2 tabletter	Lös upp varje tablett i 500 ml destillerat vatten. Förvara lösningen i 2-8°C. Användes inom 4 veckor
Enzymsubstrat (TMB)	1 hætteglas 22 ml	Klar til brug Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen Lysfølsomt!
Stopopløsning** 0.5 M H ₂ SO ₄	1 hætteglas 7 ml	Klar til brug Opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen

Kontrol 1 (human COMP i buffer)	1 hætteglas 0,5 ml	Lyofiliseret Tilsæt 0,5 ml destilleret vand* <i>Rekonstitueret kontrol: opbevares ved 2-8°C i 4 uger eller ved -20°C indtil udløbsdatoen</i>
Kontrol 2 (human COMP i buffer)	1 hætteglas 0,5 ml	Lyofiliseret Tilsæt 0,5 ml destilleret vand* <i>Rekonstitueret kontrol: opbevares ved 2-8°C i 4 uger eller ved -20°C indtil udløbsdatoen</i>

*Bemærk! Alle lyofiliserede reagenser skal være ordentligt opløst.

**Datablad om materialesikkerhed fås ved henvendelse.

PRÆPARATION OG HÅNDTERING AF PRØVER OG ENZYMKONJUGAT

Prøver

Blod skal indsamles med venepunktur og efterlades til størkning, og serummet separeres med centrifugering. Præparaterne kan opbevares ved stuetemperatur (kun i forbindelse med transport) ved 2-8°C, hvis de analyseres inden for 1 uge efter indsamling, eller ved -20°C, hvis de analyseres senere.

Heparinplasma kan også anvendes.

Bemærk! EDTA-plasma og citratplasma kan ikke anvendes.

Vejledning om måling af COMP i andre kropsvæsker fås ved henvendelse til AnaMar.

Præparation af prøver og kontroller

Prøver og kontroller skal fortyndes 1/10 i prøvebuffer.

(20 µl serum + 180 µl prøvebuffer.)

Præparation af enzymkonjugat

Præparer enzymkonjugatet ved at fortynde enzymkonjugat 11X (1+10) i enzymkonjugatbuffer.

Bemærk: Konjugatmængderne skal helst justeres ved fortynding på én gang. Med andre ord skal al bufferen hældes i hætteglasset med konjugat.

Bland forsigtigt. Opbevar det fortyndede konjugat ved 2-8°C i op til 4 uger.

Alternativt kan den nødvendige mængde præpareres i henhold til nedenstående tabel. Bland forsigtigt.

Antal strimler	Enzym-konjugat 11X	Konjugat-buffert
4 strimler	350 µl	3,5 ml
6 strimler	500 µl	5,0 ml
12 strimler	1 hætteglas	1 hætteglas

ARSLER OG FORSIGTIGHEDSREGLER

- Til diagnostisk anvendelse *in vitro*. Ikke beregnet til indvendig eller udvendig anvendelse på mennesker eller dyr.
- Indholdet af dette sæt samt eventuelle residuer må ikke komme i kontakt med drøvtyggere eller svin.

Dette sæt indeholder reagenser, som kan være smitsomme!

Dette sæt indeholder reagenser, der er fremstillet af humane blodkomponenter. Kildematerialet er blevet testet med immunanalyse for hepatitis B overfladeantigen og for antistoffer mod HIV og er konstateret negativ. Alligevel skal alle anbefalede forholdsregler for håndtering af blodderivater overholdes. Der henvises til HHS Publication no. (CDC) 88-8395 eller de tilsvarende lokale/nationale retningslinjer for sikkerhedsprocedurer for laboratorier.

Stopopløsningen består af fortyndet svovlsyreopløsning. Undgå kontakt med baser, metaller eller andre forbindelser, som kan reagere med syrer. Svovlsyre er et giftigt og korroderende stof, som kan være toksisk ved indtagelse. For at forebygge kemiske forbrændinger skal kontakt med hud og øjne undgås.

PROCEDURE

Procedurens parametre

Mængder pr. brønd:

Prøve	25 µl
Konjugat	100 µl
Enzymsubstrat	200 µl
Stopopløsning	50 µl

Inkubationstid og -temperatur:

1. inkubation 120 min på en pladerystet ved stuetemperatur, 20-28 °C.
2. inkubation 15 min ved stuetemperatur

Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

- 25 µl mikropipette med engangsspidser
- 50 µl, 100 µl og 200 µl gentagende pipetter
- 1000 ml bægerglas
- Destilleret vand
- EIA pladelæser med 450 nm filter
- Pladeryster
- Vaskeanordning til mikrotitreringsplader

Referencemateriale

COMP-kalibratorerne er kalibreret i forhold til en intern standard, som er sammenlignet med en COMP-inhibitionsassay, der er beskrevet af Saxne og Heinegård i *Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood*, udgivet i British Journal of Rheumatology vol 31 pp 583-591 (1992).

Interferens

Reagenserne i sættet er tilsat komponenter for at forebygge interferens fra muse- og RF-antistoffer i patientens sera.

Testprocedure

Udarbejd en kalibratorkurve for hver analysekørsel. Alle reagenser og prøver skal have opnået stuetemperatur inden brug. Kontrollerne skal behandles som prøver. Det anbefales, at hver bestemmelse udføres i to eksemplarer for kalibratorer og ukendte prøver.

Tilsæt i anti-COMP-brøndene

- | | |
|--|--------|
| 1. Kalibratorer | 25 µl |
| 2. Fortyndede kontroller og fortyndede prøver | 25 µl |
| 3. Enzymkonjugat | 100 µl |
| 4. Inkuber på en pladeryster og ryst kraftigt (f.eks. 250 rpm Ø 16mm) i 2 timer ved stuetemperatur. | |
| 5. Vask 6 gange med en automatisk vaskeanordning eller:
Afsug reaktionsblandingen. Tilsæt 350 µl vaskeopløsning i hver brønd.
Afsug helt. Gentag 5 gange.
Vend pladen om efter sidste vask og bank den kraftigt mod absorberende papir. | |
| 6. Tilsæt 200 µl enzymsubstrat (TMB) | |

-
7. Inkuber i 15 minutter
 8. Tilsæt 50 µl stopopløsning.
 9. Sæt pladen på pladerysteren i cirka 5 sekunder for at sikre, at substrat og stopopløsning blandes.
-
10. Mål absorbansen ved 450 nm og foretag en evaluering.

Kvalitetskontrol

- Absorbansen for laveste COMP ELISA kalibratoren skal være større end absorbansen for COMP ELISA prøvebufferen.
- Koncentrationerne af COMP ELISA kontrol 1 og 2 skal befinde sig inden for det værdiområde, der er angivet på mærkaten.

Koncentrationerne af COMP er fastlagt for hvert lot af kontroller med anvendelse af AnaMars COMP ELISA. Gennemsnitsværdi og standardafvigelse er angivet på mærkaterne på de respektive hætteglas. Hver gennemsnitsværdi er baseret på seks gentagelser i seks på hinanden følgende kørsler.

Som det er tilfældet med alle immunanalyser, påvirkes resultaterne af de procedurer og det udstyr, der anvendes af det enkelte laboratorium. Det anbefales derfor, at man i laboratoriet fastlægger sine egne gennemsnitsværdier og acceptkriterier (f.eks. 2 S.D. eller 3 S.D.). Et område på ± 2 S.D. bør omfatte 95% af de enkelte bestemmelser i et datasæt med normal fordeling.

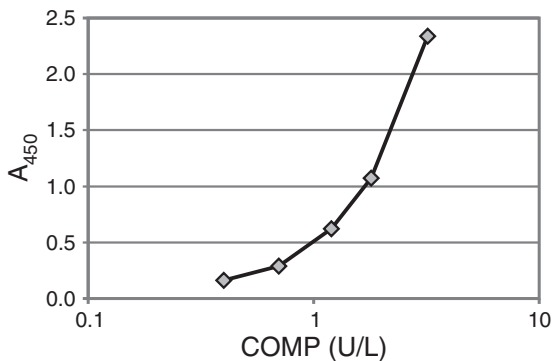
Eksempel på arbejdsark

Brønde	Betegnelse
1A-B	Prøvebuffer
1C-D	Kalibrаторer 0,4 U/L*
1E-F	Kalibrаторer 0,7 U/L*
1G-H	Kalibrаторer 1,2 U/L*
2A-B	Kalibrаторer 1,8 U/L*
2C-D	Kalibrаторer 3,2 U/L*
2E-F	Kontrol 1
2G-H	Kontrol 2
3A-B	Ukendt1

*Koncentration oplyst på hætteglassets etiket.

Kalibratorkurve

En typisk kalibreringskurve vises i nedenstående. Brug ikke denne kurve til fastlæggelse af de faktiske analyseresultater.



BEREGNING AF RESULTATER

Beregning på computer

Datareduktion af absorbansen for kalibratorerne kontra koncentrationen kan udføres på computer med anvendelse af cubic spline eller fire-parameterregression med henblik på at beregne koncentrationen af COMP. Koncentrationen af de ukendte prøver multipliceres med fortyndingsfaktoren (f.eks. X 10).

Manuel beregning

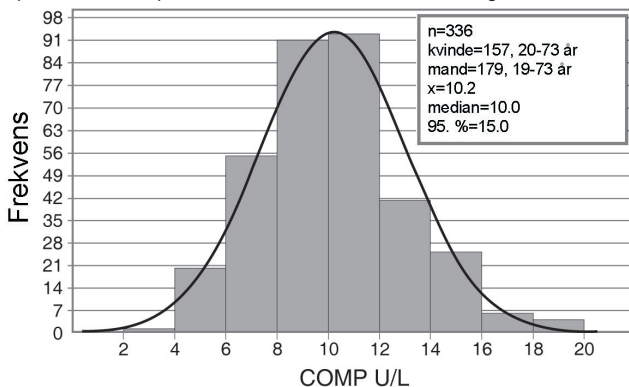
1. Plot værdierne for absorbans, der er indhentet for kalibratorerne i forhold til COMP-koncentrationen, ind på et lin/log-papir og konstruer en kalibratorkurve.
2. Aflæs koncentrationen af de ukendte prøver på kalibratorkurven.
3. Multipliser resultaterne med fortyndingsfaktoren (x10).

FORVENTEDE VÆRDIER

Forventede værdier for bloddonorer

Som god praksis bør det enkelte laboratorium fastlægge sine egne forventede værdiområder. Nedenstående resultater kan være en rettesnor, indtil laboratoriet selv har indsamlet tilstrækkelige data.

Alle prøver var serumprøver, indsamlet fra bloddonorer i Sverige.



COMP i tidlig og sen RA

I en undersøgelse af 183 patienter med reumatoid arthrit var koncentrationen af COMP ved undersøgelsens start forbundet med risikoen for omfattende destruktion af mindre led efter 5 år. Odds ratio pr. COMP-enhed i serum var 1,21 (konfidensinterval (CI) 1,07-1,36, $p < 0,002$). Disse data blev anvendt til at beregne den relative risiko for at udvikle leddestruktion over den 75. percentil (Larsen-score > 59 af 200) efter 5 år (17). Andre data, der er offentliggjort af Skoumal M *et al.*, indikerer, at denne forbindelse til destruktion af mindre led også ses hos patienter med længerevarende sygdom (18).

Fortolkning

Nedenstående retningslinjer kan anvendes i vurderingen af den igangværende brusksmætning og risikoen for fremtidig leddestruktion.

- < 12 U/L Lavere risiko for aggressiv leddestruktion*
- 12-15 U/L Stigende risiko for aggressiv leddestruktion*
- > 15 U/L Stor risiko for aggressiv leddestruktion*

* Et forhøjet niveau af ESR øger yderligere risikoen for aggressiv leddestruktion i RA (17).

FUNKTIONSDATA

Detekteringsgrænse⁽¹⁾

Detekteringsgrænsen er <0,1 U/L.

Parallelisme⁽¹⁾

Serumprøverne blev fortyndet 10, 20 og 40 gange med anvendelse af prøvefortynderen. De observerede opnåede/forventede værdier for 1/20 og 1/40 var inden for området 93-116%.

Hook-effekt⁽¹⁾

Prøver, der er fortyndet 1/10, kan have en koncentration på mindst 200 U/L uden at give ukorrekt lave koncentrationer.

Nøjagtighed⁽¹⁾

Hver prøve blev analyseret i fire kopier og ved seks forskellige lejligheder.

Prøve	Gennemsnitsværdi U/L	Variationskoefficient		
		inden for analyse %	mellem analyse %	analyse i alt %
1	6,9	3,0	1,8	3,5
2	13,1	1,9	2,7	3,3
3	18,0	1,7	4,2	4,5

Noter

⁽¹⁾Undersøgelser udført hos AnaMar Medical, Uppsala, Sverige

PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

En definitiv klinisk diagnose bør ikke baseres på en enkelt diagnostisk metode, men kun foretages af lægen, efter at de kliniske og laboratoriets resultater er blevet evalueret.

GARANTI

De funktionsdata, der er beskrevet her, blev indhentet med anvendelse af den angivne anbefalede procedure. Enhver ændring i proceduren, som ikke er anbefalet af AnaMar Medical, kan påvirke resultaterne, og i det tilfælde frasiger AnaMar Medical sig alle garantier, både udtrykkelige, indirekte og lovbestemte og herunder også indirekte garantier for salgbarhed og egnethed til et bestemt formål.

I sådanne tilfælde vil AnaMar Medical og AnaMar Medicals autoriserede forhandlere ikke være erstatningspligtige i forbindelse med hændelige skader eller følgeskader.

SYMBOLER PÅ MÆRKATERNE



n=96

Reagenser til 96 bestemmelser



Udløbsdato



2-8°C

Opbevares ved 2-8°C



Lot-nr.



Til diagnostisk anvendelse *in vitro*



Produceret af

REFERENCES/ REFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ REFERENCIAS/ RIFERIMENTI/ REFERENTIES/ BIBLIOGRAFIA/ REFERENSER/ REFERENCER

1. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, *et al.* Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage.
J Biol Chem 1992;267:6132-6.
2. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins.
J Biol Chem 1992;267:22346-50.
3. Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegard D *et al.* Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.
J Biol Chem 1997;272:14120-.
4. DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon.
FEBS Lett 1994;354:237-40.
5. Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Chen FS, Leslie M, Perris R. Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium.
FEBS Lett 1997;412:249-52.
6. Recklies AD, Baillargeon L, White C. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes.
Arthritis Rheum 1998;41:997-1006.
7. Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation.
Br J Rheumatol 1997;36:1151-60.
8. Månsson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, Heinegard D, Saxne T. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism.
J Clin Invest 1995;95:1071-7.
9. Månsson B, Geborek P, Saxne T. Cartilage and bone macromolecules in knee joint synovial fluid in rheumatoid arthritis: relation to development of knee or hip joint destruction.
Ann Rheum Dis 1997;56:91-6.

10. Marti C, Neidhart M, Gerber T, Hauser N, Michel BA, Häuselmann HJ. Cartilage Oligomerix Matrix Protein (COMP): Die Rolle eines nichtkollagenen Knorpel-Matrix-Proteins als Marker der Krankheitsaktivität und Gelenkzerstörung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose.
Z Rheumatol 1999;58:79-87.
11. Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis.
Br J Rheumatol 1992;31:593-8.
12. Petersson IF, Boegard T, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint.
Br J Rheumatol 1998;37:46-50.
13. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Dragomir AD, Luta G, Kraus VB. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity.
Arthr Reum 1999;42:2356-64.
14. Petersson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis.
Osteoarthritis and Cartilage 1998;6:33-39.
15. Vingsbo-Lundberg C, Saxne T, Olsson H, Holmdahl R. Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in chronic erosive arthritis in rats.
Arthritis Rheum 1998;41:544-50.
16. Larsson E, Mussener A, Heinegard D, Klareskog L, Saxne T. Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in rats with collagen arthritis.
Br J Rheumatol 1997;36:1258-61.
17. Lindqvist EK, Eberhardt K, Saxne T, Heinegård D, Serum COMP for risk assessment of joint destruction in early rheumatoid arthritis.
Presented at EULAR 2002.
18. Skoumal M, Kolarz G, Klingler A, Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein: A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis.
Scand J Rheumatol 2003;32:156-161









AnaMar Medical AB

Kungsporsavenyn 22

SE-411 36 Göteborg

Sweden

Tel: +46 31 732 41 40

Fax: +46 31 732 41 49

e-mail: info@anamar.com

web: www.anamar.com

