Instruction

Wieslab® hCOMP quantitative kit

Enzyme immunoassay for detection of human COMP
(Cartilage Oligomeric Matrix Protein)

Microtitration strips (12x8) 96 wells
Store the kit at +2-8° C

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Document No. E-23-0179-04 RUO
October, 2013

Wieslab® hCOMP quantitative kit

REF **COMP 200 RUO**

Σ
96

PURPOSE OF RESEARCH PRODUCT

The Wieslab® hCOMP is an enzyme immunoassay for quantitation of intact or fragmented human Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in serum or synovial fluid. The assay serves as an indicator of COMP turnover. The analysis should be performed by trained laboratory professionals. The result shall not be used for clinical diagnosis or patient management.

.

Summary and explanation

COMP is a high molecular weight, multi-submit protein originally isolated from cartilage (Hedbom et al., 1992; Mörgelin et al., 1992). The protein is abundant in cartilage but is also found in tendon and other tissues (DiCesare et al., 1994). The protein belongs to the thrombospondin family (Oldberg et al., 1992).

Measurement of intact COMP and fragments thereof in synovial fluid or serum have been shown to correlate to cartilage destruction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patient studies (Månsson et al., 1995; Saxne and Heinegård, 1992; Sharif et al., 1995). In synovial fluid COMP is present to some extent as an apparently intact protein but the majority is found as several different fragments (Neidhart et al., 1997). In serum the fragments are 50-90 kDa. The exact nature of the fragments is not known.

Principle of the Wieslab® COMP assay

The assay utilises native human articular cartilage COMP coated to 96-well microtiter plates and a rabbit polyclonal antiserum directed to human COMP. It is in standard ELISA inhibition format with an overnight preincubation step with sample and primary antiserum. After the overnight preincubation the solution is transferred to the COMP coated plate. Bound antibody is detected using an alkaline phosphatase labelled anti rabbit IgG conjugate.

Warnings and precautions

- ***For Research Use Only.***
- The human serum components used in the preparation of the controls and calibrators in the kit have been tested for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitis C (HCV) as well as hepatitis B surface antigen by FDA approved methods and found negative. Because no test methods can offer complete assurance that HIV, HCV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens and human-based reagents should be handled as if capable of transmitting infectious agents.
- The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommended that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
- All solutions contain ProClin 300 as a preservative. Never pipette by mouth or allow reagents or patient sample to come into contact with skin. Reagents containing ProClin may be irritating. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact, flush with plenty of water.
- The concentrations of COMP in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity.
- Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	C1
CONTROL	C2
SUBS	pNPP
Anti-COMP	

Warning

Contains ProClin 300:
Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	May cause an allergic skin reaction.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P302+352:	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+313:	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

Kit components and storage of reagents
- One frame with strips (12x8) coated with COMP and one lid sealed in a foil pack with a dry pack.
- Six calibrators 600 µL/each, (10, 20, 30, 40, 60, 80 ng/mL), containing COMP in diluent, sufficient for three calibrator curves.
- Two prediluted control sera (C1 and C2), 600 µL each.
- 2 x 32 mL diluent i.e. sample dilution buffer (red colour).
- 8 mL anti-COMP reagent for preincubation (red colour).
- 13 mL conjugate buffer with alkaline phosphatase labelled conjugate directed against rabbit IgG (blue colour).
- 30 mL wash buffer 30x concentrated.
- 13 mL pNPP-substrate solution

All reagents, except the wash solution, are ready for use. For storage keep all components refrigerated at 4° C. Remove only the number of COMP coated strips needed for testing, resealing the foil package carefully.

Materials or equipment required but not provided
- 96-well round bottom preincubation plate.
- Microplate reader with filter 405 nm.
- Precision pipettes with disposable tips.
- NaCl, Tween 20 and distilled water for preparing more washing solution.
- Washer for strips, absorbent tissue, tubes and a timer.

Specimen collection
Serum samples are quite stable with normal handling and refrigerated storage for shorter periods. However, for extended periods of storage samples should be stored frozen at –20° C. Freezing and thawing of serum samples have little effect on COMP levels but should always be avoided since precipitations may occur. Synovial fluid samples appear to be more sensitive to degradation.
Avoid using sera which are icteric, lipemic and hemolyzed.
The NCCLS provides recommendations for storing blood specimens, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

PROCEDURE
All calibrators, controls and samples should be tested in duplicate.
All solutions should be allowed to reach room temperature before use.

- FIRST DAY (AFTERNOON) -

Dilution of serum and preincubation with first antibody
1. Dilute serum samples 1/50 with the dilution buffer. Dilute synovial fluid 1/500.
   (Serum samples should be diluted 1/30 or more. Recommended dilution of serum samples is 1/50. Synovial fluids should be diluted 1/200 or more. Recommended starting dilution is 1/500.)

2. Pipet 75 µL of calibrators C10, C20, C30, C40, C60, C80 and controls C1, C2 and the diluted samples (S) into a preincubation plate (round bottom plate) according to the diagram below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C80	C20	S1									
B	C80	C20	S1									
C	C60	C10	S2									
D	C60	C10	S2									
E	C40	C1	etc									
F	C40	C1										
G	C30	C2										
H	C30	C2										

3. Add 75 µL of anti-COMP reagent to all wells, mix on a shaker for 5 min. Incubate overnight (12-18 hrs) at about 4° C

- SECOND DAY -
All solutions should be allowed to reach room temperature before use.

Preparation of washing solution
Dilute 10 mL of the 30x concentrated wash solution in 290 mL distilled water. When stored at 2-8° C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.
If necessary, more wash solution can be prepared by dissolving 9.0 g NaCl in 1.0 L distilled water, add 0.5 mL Tween 20, and mix.

Incubation in the antigen coated plate
1. Transfer 100 µL from each well in the preincubation plate to the antigen coated plate.
2. Incubate at room temperature for 60 minutes.

After sample incubation
Wash 3 times with washing solution (approximately 300 µL/well), by filling and emptying the wells each time; after the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.

Adding conjugate
Add 100 µL conjugate to each well. Incubate for 60 minutes.

After conjugate incubation
Wash as before.

Adding substrate solution
Add 100 µL pNPP-substrate solution to each well, incubate for 60 minutes ± 10 minutes.
Read the absorbance at 405 nm on a microplate reader.

Analysis of results
Calculate amount of COMP in sample by using appropriate software. Best curve fitting results are obtained using a curve fitting algorithm like spline. To calculate levels in serum or other samples remember to adjust for dilutions.

Quality Control
The control values of C1 and C2 and the limits are shown in the QC certificate. Actual control ranges should be established in your laboratory.

Expected results
Serum levels of COMP in 80 unselected blood donors age 22-59 were found to be 1.35 ± 0.40 µg/mL (range 0.99 – 2.54). No normal values are available for synovial fluids but values are generally about ten to twenty times higher than serum levels. In a clinical material of knee synovial fluids COMP ranged from 14 to 48 µg/mL.

Performance characteristics

Intra-assay precision was determined by testing two samples in duplicate. Each sample was assayed 20 times on the same plate.

Sample	Mean (µg/mL)	S.D.	C.V.%
1	1.03	± 0.11	± 10.7
2	1.71	± 0.06	± 3.5

Inter-assay precision was determined by testing two samples in duplicate. Results were obtained from fifteen different runs.

Sample	Mean (µg/mL)	S.D.	C.V.%
1	0.97	± 0.10	± 10.3
2	1.82	± 0.12	± 6.6

Troubleshooting

Problem:	Possible causes:	Solution:
Control values out of range.	**1.** Incorrect temperature, timing or pipetting; reagents not mixed.	**1.** Check that the time and temperature was correct. See ”Poor precision” below. Repeat test.
	2. Cross contamination of controls.	**2.** Pipette carefully.
	3. Improper dilution.	**3.** Repeat test.
	4. Optical pathway not clean.	**4.** Check for dirt or air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread.
All test results negative.	**1.** One or more reagents not added, or added in wrong sequence.	**1.** Recheck procedure. Check for unused reagents. Repeat test.
	2. Antigen coated plate inactive.	**2.** Check for obvious moisture in unused wells. Wipe bottom and reread.
All test results yellow.	**1.** Contaminated buffers or reagents.	**1.** Check all solutions for turbidity.
	2. Washing solution contaminated.	**2.** Use clean container. Check quality of water solution used to prepare.
	3. Improper dilution of serum.	**3.** Repeat test.
Poor precision.	**1.** Pipette delivery CV greater than 5%.	**1.** Check calibration of pipette. Use reproducible technique.
	2. Serum or reagents not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature.	**2.** Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature.
	3. Reagent addition taking too long; inconsistency in timing intervals.	**3.** Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto dispenser to decrease time.
	4. Optical pathway not clean.	**4.** Check for air bubbles in the wells. Wipe bottom and reread.
	5. Washing not consistent; trapped bubbles; washing solution left in the wells.	**5.** Check that all wells are filled and aspirated uniformLy. Dispense liquid above level of reagent in well. After the last wash, empty the wells by tapping the strip on an absorbent tissue.
	6. Improper pipetting.	**6.** Avoid air bubbles in pipette tips.

References

1. **DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett. 354, 237-240.

2. **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992).** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem. 267, 6132-6136.

3. **Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., and Paulsson, M. (1992).** Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J.Biol.Chem. 267, 6137-6141.

4. **Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995).** 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. 95, 1071-1077.

5. **Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997).** Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br.J.Rheum. 36, 1151-1160.

6. **Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992).** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J.Biol.Chem. 267, 22346-22350.

7. **Saxne, T. and Heinegård, D. (1992).** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar;32(3):247]. Br.J.Rheumatol. 31, 583-591.

8. **Sharif, M., Saxne, T., Shepstone, L., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Heinegård, D., and Dieppe, P.A. (1995).** Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 34, 306-310.

9. **Volck, B., Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Garbarsch, C., Price, P.A., Østergaard, M., Østergaard, K., Løvgreen-Nielsen, P., Sonne-Holm, S. and Lorenzen, I. (2001).** Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology.

10. **Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas P.D. and Vignon, E. (2001).** Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann. Rheum. Dis. 60, 619-626.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de simbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Förklaringar till symboler.

	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	Warning. Attention. Atensión. Achtung. Attenzione. Varning.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene.
DIL	Diluent. Diluant.Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert/Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontroll.
Anti-COMP	Anti-COMP reagent, Anti-COMP Reagenz, Anti-COMP Reactivo, Reagente anti-COMP, Anti-COMP reagens

INSTRUCTION ABREGEE SUR LE MANIEMENT ET L'EXECUTION

Indication d'utilisation

La trousse Wieslab™ hCOMP utilise une méthode immuno-enzymatique *(ELISA)* pour la détection et la détermination d'Human-Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP) intacts ou fragmentés, un composant dominant des tissus cartilagineux. Le résultat peut servir d'indice en cas de soupçon de hCOMP. L'analyse doit être effectuée par du personnel qualifié.
Le résultat ne doit pas être utilisé pour le diagnostic clinique ou le traitement des patients.

Prelevement d'echantillons

L'analyse- hCOMP est à utiliser avec des échantillons sériques. Veuillez penser à manipuler les contenus d'éprouvettes et surtout les échantillons sériques comme étant susceptibles de transmettre des agents infectieux.
Eviter d'utiliser du sérum ictérique, lipémique ou hémolysé. Le sérum inactivé par la chaleur peut montrer des réactivités non spécifiques et ne devrait donc pas être analysé.
Les échantillons peuvent être conservés à 2-8° C si l'analyse est réalisée dans les jours suivants. Pour des périodes plus longues, conserver le sérum à –20° C ou à température inférieure. Ne pas utiliser de congélateurs à décongélation automatique, qui pourraient faire subir à l'échantillon des cycles de congélation-décongélation dégradant l'anticorps. Les échantillons qui ont été conservés de façon inadéquate ou qui ont subi des cycles de congélation-décongélation peuvent donner de faux résultats.
Le NCCLS a publié des directives pour la conservation des échantillons sanguins (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Precautions d'emploi

- ***Les produits sont destinés à la recherche uniquement.***
- Le sérum humain pour la préparation de contrôles et de calibration a été testé négatif à la présence d'anticorps au virus humain immunodéficiant 1 & 2 (VIH 1&2), hépatite C (VHC), aussi bien qu'à l'hépatite B antigènes de surface. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, VIH ½, VHC et Hepatite B ou autres composants infectieux, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux.
- C'est pourquoi il faudra manipuler avec précaution tout échantillon d'origine humaine.
- Le Centers for Disease Control and Prevention (CDC) et le National Institutes of Health (NIH) aux USA recommandent d'analyser en laboratoire les matériaux potentiellement infectieux en niveau de sécurité 2.
- Toutes les solutions contiennent du ProClin 300 comme conservateur. Ne jamais pipeter avec la bouche. Evitez tout contact direct avec la peau lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons de patients. Les réactifs contenant du ProClin 300 peuvent être irritants. C'est pourquoi il faut absolument éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, laver immédiatement les parties touchées avec une grande quantité d'eau.
- On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès d'Euro Diagnostica.

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	C1
CONTROL	C2
SUBS	pNPP
Anti-COMP	

Attention

Contient ProClin 300:
Masse de réaction de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Peut provoquer une allergie cutanée.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+352:	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P333+313:	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

Materiel necessaire mais non fourni

- Lecteur de plaque avec filtre à 405 nm.
- Plaques de préincubation (96 well, fond rond)
- Micropipettes de précision avec embouts jetables.
- Dispositif de lavage des microplaques, papier absorbant, tubes et minuterie.

Contenu du paquet et sa conservation

- Un cadre avec des languettes d'échantillons (12x8 well) enduites d'une préparation de Human-Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP), y compris le couvercle correspondant. Le tout conditionné dans un sachet étanche contenant un déshydratant.
- Un flacon de 0,6 mL, contrôle négatif (C1), sérum humain dans le diluant.
- Un flacon de 0,6 mL, contrôle positif (C2), sérum humain dans le diluant.
- Un flacon de 13 mL, solution conjuguée, avec de la phosphatase alcaline conjuguée à des anticorps anti-IgG de lapin purifiés (couleur bleue).
- 2 x 32 mL, tampon diluant (couleur rouge) contenant une solution PBS.
- Un flacon de 8 mL Anti-COMP Reagenz
- Un flacon de 13 mL, solution de substrat pNPP.
- Un flacon de 30 mL, solution de lavage (30 x concentrée)
- Six flacons de calibration - étalons, chacun de 0,6 mL (10, 20, 30, 40, 60, 80) en hCOMP purifié, dans le diluant.

Tous les composants cités précédemment, sauf les solutions de lavage dans la trousse, sont immédiatement prêts à l'emploi. Conserver la trousse entre +2-8° C et prière de n'extraire que le nombre de barrettes nécessaire. Les barrettes restantes doivent être conservées dans le sachet fermé.

PREPARATION DES REACTIFS

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante de (20-25° C). Pour éviter l'évaporation, il est nécessaire d'utiliser un couvercle. Toutes les solutions de calibration les contrôles et les échantillons doivent être analysés en doublés.

- JOUR 1 (APRES-MIDI) -

Dilution d'échantillons et temps de préincubation avec Anti – COMP - Reagenz

1. Diluer le sérum de patient, dilution recommandée du sérum 1/50, dilution recommandée du liquide Synovial 1/500.
2. Pipeter 75 µL/well (en doublets) comme suit: solution de calibration C10, C20, C30, C40, C60, C80, contrôle C1, contrôle C2 et sérum de patient (P) selon le tableau de distribution ci-après.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C80	C20	P1									
B	C80	C20	P1									
C	C60	C10	P2									
D	C60	C10	P2									
E	C40	C1	Etc									
F	C40	C1										
G	C30	C2										
H	C30	C2										

3. Ajouter 75 µl Anti-COMP Reagenz dans chaque puits. Mélanger 5 minutes. Conserver pendant la nuit (12-18 heures) à +4° C.

- JOUR 2 -
Réchauffer toutes les solutions à température ambiante avant l'emploi.

Procédure de dosage
Diluer 10 mL de solution de lavage concentrée 30 fois (X30) dans 290 mL d'eau distillée. Conservée à 2-8 ° C, la solution de lavage diluée est stable jusqu'à la date de péremption de la trousse.
Pour obtenir une quantité supplémentaire de solution de lavage, diluer 9 g NaCl dans 1,0 litre d'eau et y ajouter 0,5 mL Tween 20.

Incubation sur la plaque enduite d'antigènes
1. Transférer 100 µL de la plaque de préincubation sur la plaque antigène.
2. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante.

Après l'incubation des échantillons / Supplément de solution conjuguée
Laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage par puits, en remplissant et vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, tapoter délicatement les barrettes sur du papier absorbant.
Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque puits. Incuber de nouveau pendant 60 min à température ambiante.

Après incubation du conjugué
Laver comme indiqué plus haut.

Addition de solution de substrat
- Ajouter 100 µL de solution de substrat dans chaque puits et incuber la microplaque pendant 60 min (± 10 min) à température ambiante (20-25° C).
- Lire l'absorbance sur un lecteur de microplaque à 405 nm.

Calculs des résultats
1. Dessiner la courbe d'étalonnage en traçant les 6 valeurs d'absorbance par rapport aux valeurs en unités arbitraires respectives. Utiliser un programme de calculation comme par exemple Spline.
2. Déterminer à l'aide de la courbe d'étalonnage les quantités de hCOMP dans chacun des échantillons.
3. Ne pas oublier de prendre en compte la dilution dans le calcul des quantités de sérum ou de liquide Synovial.

Contrôle de qualité
Les valeurs de contrôle C1 et C2 peuvent être lues sur le certificat du lot.
Les contrôles C1 et C2 sont prévus pour contrôler tout défaut substantiel des réactifs.
Si l'une des valeurs ne donne pas les résultats attendus, le test doit être considéré comme non valide et il doit être refait.

Interprétation des résultats
Dans une étude de 80 donneurs de sang est apparu que le niveau du sérum de hCOMP s'est trouvé vers 1,35 ± 0,40 µg/mL (range 0,99 – 2,54). Les valeurs normales dans le liquide Synovial ne peuvent être atteintes, mais sont environ 10 à 20 fois plus élevées que le niveau du sérum. Dans le matériau clinique d'un genou, la valeur du liquide Synovial varie entre 14 – 48 µg/mL.

References

1. **DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett. 354, 237-240.

2. **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992).** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem. 267, 6132-6136.

3. **Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., and Paulsson, M. (1992).** Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J.Biol.Chem. 267, 6137-6141.

4. **Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995).** 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. 95, 1071-1077.

5. **Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997).** Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br.J.Rheum. 36, 1151-1160.

6. **Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992).** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J.Biol.Chem. 267, 22346-22350.

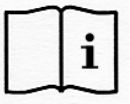
7. **Saxne, T. and Heinegård, D. (1992).** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar;32(3):247]. Br.J.Rheumatol. 31, 583-591.

8. **Sharif, M., Saxne, T., Shepstone, L., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Heinegård, D., and Dieppe, P.A. (1995).** Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 34, 306-310.

9. **Volck, B., Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Garbarsch, C., Price, P.A., Østergaard, M., Østergaard, K., Løvgreen-Nielsen, P., Sonne-Holm, S. and Lorenzen, I. (2001).** Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology.

10. **Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas P.D. and Vignon, E. (2001).** Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann. Rheum. Dis. 60, 619-626.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de simbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Förklaringar till symboler.

	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	Warning. Attention. Atensión. Achtung. Attenzione. Varning.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene.
DIL	Diluent. Diluant.Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert/Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontroll.
Anti-COMP	Anti-COMP reagent, Anti-COMP Reagenz, Anti-COMP Reactivo, Reagente anti-COMP, Anti-COMP reagens

INSTRUCCIONES DE USO EN VERSIÓN BREVE EN ESPAN□OL

Utilización de los productos

Wieslab™ hCOMP Test Set es una prueba inmunológica de acoplamiento de enzimas para la identificación y análisis cuantitativo (ELISA) de cartílagos oligoméricos matrix proteína humanos (hCOMP), intactos o fragmentados, un componente dominante en el tejido cartilaginoso. El resultado puede ser un sospechoso indicio de hComp la cual debe verse como reflexión de la bioactividad del tejido cartilaginoso. El análisis debe ser realizado por personal calificado.
El resultado no deberá ser utilizado para el diagnóstico clínico y el tratamiento de los pacientes.

Toma de muestras

El análisis hCOMP está concebida para las pruebas de suero. Por favor considere que los diferentes reactivos y sobre todo los sueros pueden tener componentes potencialmente infecciosos. No analice pruebas que sean ictéricas, lípidos o hemolíticas. El suero no activado por calor puede mostrar actividad no específica y por tanto no debe ser analizado. Las pruebas pueden ser conservadas entre 2-8° C cuando los análisis se realicen en los próximos días. La conservación a largo plazo debe realizarse a -20° C o más. Los congeladores con autodescongelación no son apropiados para estos casos debido al riesgo de descongelación de las pruebas. Las pruebas que no han sido debidamente almacenadas pueden arrojar resultados erróneos. NCCLS tiene las normativas para el almacenamiento de sangre (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Información de seguridad

- ***Los productos están destinados sólo para uso en investigación.***
- El suero para la preparación de controles y calibración fué probado negativamente en antígenos de superficie contra anticuerpos de la debilidad inmunológica humana Viren 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV), Hepatitis B. Es de considerarse en todo caso que ningún método puede garantizar la ausencia de HIV, HCV, Hepatitis B-Virus u otros componentes infecciosos.
- Todas las muestras humans deben ser consideradas potencialmente infecciosas y manipularse con el cuidado requerido.
- El Centers for Disease Control and Prevention (CDC) y el National Institutes of Health (NIH) en USA recomiendan, que materiales potencialmente infecciosos se investiguen en laboratorios de nivel de seguridad 2.
- Todas las soluciones contienen ProClin 300 como conservante. No manipule nunca la pipeta con la boca.
- Evite el contacto con la piel o los ojos. En el caso de que un reactivo entre en contacto con la piel o los ojos, enjuague inmediatamente y con cuidado la zona afectada con gran cantidad de agua.
- Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	C1
CONTROL	C2
SUBS	pNPP
Anti-COMP	

Atención

Contiene ProClin 300:
Masa de reacción de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P264:	Lávese bien las manos después de manipular.
P280:	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+352:	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P333+313:	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Equipo adicional requerido que no es parte integrante del set
- Espectrofotómetro con filtro de 405 nm
- Pipeta de precisión con unidad desechable
- Instalación de lavado para placas de Microtiter, papel secante, tubos de ensayo y cronómetro.

Contenido del empaque y conservación
- Un cuadro con tiras de muestra (12x8 well), que estan recubiertas y preparadas con Human-Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP) y su respectiva tapa. Todo con una sustancia secante en una bolsa de material a prueba de aire que puede volverse a cerrar.
- 0,6 mL Kontroll (C1), suero humano pre diluído en Diluent.
- 0,6 mL Kontroll (C2), suero humano pre diluído en Diluent.
- 13 mL solución conjugat, con fosfatasa ascalina acoplada a anticuerpos Anti-Conejo IgG
- 2 x 32 mL Diluyente, ”Diluent” (Dil) , contiene PBS (Color rojo).
- 8 mL Anti-COMP Reactivo
- 13 mL Solución sustrato pNPP
- 30 mL Solución de lavado (30 x concentrada)
- 6 Soluciones de calibración con 0,6 mL (10, 20, 30, 40, 60, 80) de puro hCOMP in Diluent.

Todos los componentes nombrados, excepto la solución de lavado en el Set, están listas para ser utilizadas al momento. Conserve el Set en el refrigerador a +2-8°C Por favor extraiga solo las pruebas que necesite. Las pruebas restantes deben ser conservadas en una bolsa cerrada.

PROCEDIMIENTO
Antes de usar las soluciones dejarlas que tomen la temperatura ambiente. Todas las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente (20-25° C). Para evitar la evaporación deben taparse. Todas las soluciones de calibración, controles y pruebas deben ser realizadas por duplicado.

(1ER DÍA)

Dilucíon de Pruebas y Preincubación con reactivos con Anti – COMP
1. Diluya la prueba del paciente. Dilucion recomendadada de suero 1/50. Dilución recomendada del del líquido sinovial 1/500.
2. Extraiga con la Pipeta 75 µL/well en duplicado como sigue: Solución de calibración C10, C20, C30, C40, C60, C80, Control C1, Control C2, und Pruebas de pacientes (P) como se muestra en el diagrama.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C80	C20	P1									
B	C80	C20	P1									
C	C60	C10	P2									
D	C60	C10	P2									
E	C40	C1	Etc									
F	C40	C1										
G	C30	C2										
H	C30	C2										

3. Anãda 75 µL de reactivo Anti-COMP a cada set de reactivo. Mezcle durante 5 minutos. Durante la noche (12-18 horas) consérvelo a +4°C.

2DO DÍA
Antes de usar las soluciones, dejarlas que tomen la temperatura ambiente.

Preparación de solución de lavado.
Diluya 10 mL de una solución de lavado 30 X concentrada en 290 mL de agua destilada. La solución de lavado diluída puede conservarse entre 2-8° C hasta la fecha de su vencimiento.

Incubación sobre una placa recubierta de Antígeno
Traslasde de la placa de incubación 100 µL a la placa de Antígeno. Incúbese 60 minutos a temperatura ambiente.

Después de la aprueba de incubación / Adición de solución conjugat
Lávese 3 veces con 300 µL de solución de lavado. Con cada ciclo de lavado sea muy cuidadoso al vaciar y rellenar las probetas. Después del último lavado, debe extraerse el líquido restante mediante papel absorbente (tiras de muestras) .
Anãda 100 µL de solución conjugat a cada set de reactivo. Incúbese durante 60 minutos.

Después de la incubación con conjugat
Lávese como se indica ariba.

Adición de solución substrato
Anexe 100 µL de solución substrato a cada reactivo. Incúbese durante 60 minutos (± 10 minutos). Mida la absorción con un espectrofotómetro de 405nm.

Calculación
Indique una curva de calibración en donde se registren las 6 absorciones de calibración en contra de las respectivas unidades arbitrarias. Utilize el programa de calculación como por ejemplo: Spline. Determine con ayuda de la curva de calibración la cantidadde hCOMP en cada prueba. Incluya el cálculo de la cantidad de dilución de suero o líquido sinovial.

Control de calidad
Los valores de control para C1 y C2 se obtienen del certificado de la sonda. Los valores C1 y C2 son utilizados para verificar si el Set ha funcionado técnicamente. En caso de que uno o varios valores no estén en los valores anteriormente indicados, el Test debe ser considerado no válido y deberá repetirse.

Resultados esperados
En un estudio con 80 donantes de sangre se registró un nivel de suero de hCOMP con 1,35 ± 0,40 µg/mL (range 0,99 – 2,54). Los valores normales en el líquido sinovial no son alcanzables pero son aproximadamente de 10 a 20 veces más altos que en el nivel de suero. En el material clínico de una rodilla el valor del líquido sinovial oscilaba entre 14 – 48 µg/mL.

References

1. **DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett. 354, 237-240.

2. **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992).** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem. 267, 6132-6136.

3. **Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., and Paulsson, M. (1992).** Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J.Biol.Chem. 267, 6137-6141.

4. **Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995).** 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. 95, 1071-1077.

5. **Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997).** Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br.J.Rheum. 36, 1151-1160.

6. **Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992).** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J.Biol.Chem. 267, 22346-22350.

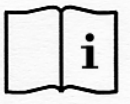
7. **Saxne, T. and Heinegård, D. (1992).** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar;32(3):247]. Br.J.Rheumatol. 31, 583-591.

8. **Sharif, M., Saxne, T., Shepstone, L., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Heinegård, D., and Dieppe, P.A. (1995).** Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 34, 306-310.

9. **Volck, B., Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Garbarsch, C., Price, P.A., Østergaard, M., Østergaard, K., Løvgreen-Nielsen, P., Sonne-Holm, S. and Lorenzen, I. (2001).** Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology.

10. **Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas P.D. and Vignon, E. (2001).** Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann. Rheum. Dis. 60, 619-626.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de simbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Förklaringar till symboler.

	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	Warning. Attention. Atensión. Achtung. Attenzione. Varning.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene.
DIL	Diluent. Diluant.Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert/Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontroll.
Anti-COMP	Anti-COMP reagent, Anti-COMP Reagenz, Anti-COMP Reactivo, Reagente anti-COMP, Anti-COMP reagens

GEBRAUCHSANWEISUNG IN DEUTSCHER KURZFASSUNG

Benutzung des Produktes

Wieslab™ hCOMP Test Set ist ein enzymgekoppelter Immunnachweis (ELISA) für die Bestimmung und Quantifizierung von intaktem oder fragmentiertem Human-Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP), ein dominierende Komponente im Knorpelgewebe. Das Resultat kann als Hinweis bei Auftrittsverdacht von hCOMPs dienen, welches als die Reflektion von der Bioaktivität des Knorpelgewebes angesehen wird.
Die Analyse soll von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.
Das Ergebnis darf nicht für die klinische Diagnose und Behandlung von Patienten verwendet werden.

Probenentnahme

Die hCOMP-Analyse ist für Serumproben gedacht. Bitte bedenken Sie, dass verschiedene Reagenzien und vor allem die Serumproben potentiell infektiöse Bestandteile beinhalten könnten. Analysieren Sie nicht solche Proben, die ikterisch, lipämisch oder hämolysiert sind. Wärmeinaktiviertes Serum kann unspezifische Aktivität zeigen und sollte deswegen nicht analysiert werden. Proben können bei 2-8°C aufbewahrt werden, wenn die Analyse innerhalb der nächsten Tage gemacht wird. Eine langfristige Aufbewahrung sollte bei - 20°C oder kälter erfolgen. Gefrierschränke mit automatischer Abtaueinrichtung sind nicht für die Aufbewahrung geeignet, da das Risiko des Auftauens der Proben besteht. Proben, die nicht ordnungsgemäß gelagert worden sind, können falsche Ergebnisse hervorrufen. NCCLS hat Richtlinien für Lagerung von Blutproben herausgegeben (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Sicherheitsinformation

- ***Die Produkte sind nur für Forschungszwecke bestimmt.***
- Das Serum für die Präparierung von Kontrollen und Kalibrierung wurde auf Antikörper gegen die menschliche Immunschwäche-Viren 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatitis C (HCV), Hepatitis B Oberflächenantigen negativ getestet. Es ist jedoch in jedem Fall zu bedenken, dass keine Methode die Abwesenheit von HIV, HCV, Hepatitis B-Virus, oder andere infektiöse Bestandteile ganz garantieren kann.
- Alle humanen Proben müssen deswegen als potentiell infektiös betrachtet und mit Sorgfalt behandelt werden.
- Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und das National Institutes of Health (NIH) in den USA empfehlen, dass potentiell infektiöse Materialien in Laboren der Sicherheitsstufe 2 untersucht werden sollten.
- Alle Lösungen beinhalten ProClin 300 als Konservierungsstoff. Pipetieren Sie niemals mit dem Mund. Vermeiden Sie direkten Kontakt bei Umgang mit Reagenz- oder Patientenproben mit der Haut. Reagenzien mit ProClin 300 wirken reizend. Deswegen sind der Kontakt mit Haut und Augen unbedingt zu vermeiden. Für den Fall dass Reagenzien mit Haut oder Augen in Berührung gekommen sind, spülen Sie sofort die betroffenen Stellen mit großen Mengen Wasser sorgfältig aus.
- Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	C1
CONTROL	C2
SUBS	pNPP
Anti-COMP	

Achtung

Enthält ProClin 300:
Reaktionsmasse aus: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
P264:	Gründlich die Hände waschen nach Gebrauch.
P280:	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
P302+352:	BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
P333+313:	Im Falle einer Hautreizung oder -ausschlags: Ärztlichen Rat einholen, bzw. zur Kenntnis bringen.

Zusätzlich erforderliche Ausrüstung, die nicht Bestandteile des Set´s sind
- Preinkubationsplatte (96 well, Rundboden)
- Spektrophotometer mit Filter für 405nm.
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen
- Waschvorrichtung für Microtiterplatten, Papier zum Abtrocknen, Reagenzgläser, Zeitschaltuhr

Verpackungsinhalt und Aufbewahrung
- Ein Rahmen mit Probestreifen (12x8 well), die mit Human-Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP) Präparat beschichtet sind, nebst zugehörigem Deckel. Alles in einem mit Trockenmittel gefülltem widerverschließbarem Beutel aus luftdichter Folie.
- 0,6 mL Kontrolle (C1), vorverdünntes Humanserum in Diluent.
- 0,6 mL Kontrolle (C2), vorverdünntes Humanserum in Diluent.
- 13 mL Konjugatlösung, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen IgG Antikörper (blaue Farbe)
- 2 x 32 mL Verdünnungspuffer, Diluent" (Dil), enthält PBS (rote Farbe).
- 8 mL Anti-COMP Reagenz
- 13 mL Substrat pNPP - Lösung
- 30 mL Waschlösung (30 x Konzentriert)
- 6 Kalibrationslösungen jeweils mit 0,6 mL (10, 20, 30, 40, 60, 80) aus reinem hCOMP in Diluent.

Alle zuvor genannten Bestandteile, außer den Waschlösungen im Set, sind für den sofortigen Gebrauch fertig vorbereitet. Bewahren Sie das Set im Kühlschrank bei +2-8°C auf Bitte entnehmen Sie nur so viele Probestreifen wie nötig. Die restlichen Probestreifen müssen in dem geschlossenen Beutel aufbewahrt werden.

TESTPROZEDUR

Alle Lösungen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen lassen. Alle Inkubationen bei Zimmertemperatur (20-25° C) durchführen. Um Verdunstung zu verhindern, muss ein Deckel benutzt werden. Sämtliche Kalibrierlösungen, Kontrollen, und Proben sollten in Duplikat analysiert werden.

- TAG 1 (NACHMITTAG) -

Probeverdünnung und Preinkubation mit Anti – COMP - Reagenz

1. Verdünnen Sie die Patientenprobe. Empfohlene Serumverdünnung 1/50. Empfohlene Verdünnung der Synovialflüssigkeit 1/500.
2. Pipettieren Sie 75 µL/Reaktionssatz in Duplikat wie folgt: Kalibrierlösung C10, C20, C30, C40, C60, C80, Kontrolle C1, Kontrolle C2, und Patientenprobe (P) wie/nach u. a. Schemata

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C80	C20	P1									
B	C80	C20	P1									
C	C60	C10	P2									
D	C60	C10	P2									
E	C40	C1	Etc									
F	C40	C1										
G	C30	C2										
H	C30	C2										

3. Fügen Sie 75 µL Anti-COMP Reagenz sämtlichen Reaktionsätzen hinzu. 5 Minuten mischen. Über Nacht (12-18 Stunden) bei +4°C lagern.

- TAG 2 -
Alle Lösungen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmen lassen.

Zubereitung der Waschlösung
Verdünnen Sie 10 mL der 30-fach konzentrierten Waschlösung mit 290 mL destilliertem Wasser. Die verdünnte Waschlösung ist bei einer Aufbewahrungstemperatur von 2-8° C bis zum Verfallsdatum des Sets haltbar. Zusätzliche Waschlösung erhält man durch die Auflösung von 9 g NaCl in 1,0L Wasser und Hinzufügen von 0,5 mL Twenn 20.

Inkubation auf der antigenbeschichteten Platte
1. Überführen Sie 100 µL von der Preinkubationsplatte auf die Antigenplatte.
2. Inkubieren Sie für 60 Minuten bei Zimmertemperatur.

Nach der Probeinkubation / Zusatz von Konjugatlösung
Waschen Sie 3 mal mit 300µL Waschlösung /Ansatz. Bitte sehr sorgfältig das Entleeren und Befüllen der Probengefäße bei jedem Waschzyklus vornehmen. Nach dem letzten Waschen müssen alle verbleibenden Flüssigkeiten durch Abschlagen der Probestreifen auf absorbierendem Papier entfernt werden.
Fügen Sie 100 µL Konjugatlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Inkubieren Sie für 60 Minuten.

Nach der Konjugatinkubation
Waschen Sie wie oben angegeben.

Hinzufügen der Substratlösung
Fügen Sie 100 µL Substratlösung zu jedem Reaktionsansatz hinzu. Für 60 Minuten (± 10 Minuten) inkubieren.
Messen Sie die Absorption mit einem Spektrophometer bei 405nm.

Berechnungen
Zeichnen Sie eine Kalibrierkurve, indem Sie die 6 Kalibrierabsorptionen gegen ihre respektiven arbiträren Einheiten eintragen. Benutzen Sie ein Berechnungsprogramm wie z.B. Spline. Bestimmen Sie mit Hilfe der Kalibrierkurve die Mengen hCOMP in der jeweilige Probe. Vergessen Sie nicht die Verdünnung bei der Berechnung von Mengen in Serum oder Synovialflüssigkeit zu berücksichtigen.

Qualitätskontrolle
Der Kontrollwert für C1 und C2 wird aus dem Lot-Zertifikat entnommen. Die C1 und C2 Kontrollen werden benutzt, um festzustellen, ob das Set technisch funktioniert hat. Falls eine oder mehrere Werte nicht innerhalb der angegebenen Größenordnung liegen, sollte der Test als nicht gültig erklärt und die Analyse wiederholt werden.

Zu erwartende Resultate
In einer Studie von 80 Blutspendern zeigte sich, dass sich das Serumniveau von hCOMP bei 1,35 + 0,40 µg/mL befand (range 0,99–2,54). Normale Werte in der Synovialflüssigkeit sind nicht erreichbar, aber sie sind ca. 10 bis 20 mal höher, als das Serumniveau. In klinischem Material eines Knies schwankt der Wert der Synovialflüssigkeit zwischen 14–48 µg/mL.

References

1. **DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett. 354, 237-240.

2. **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992).** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem. 267, 6132-6136.

3. **Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., and Paulsson, M. (1992).** Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J.Biol.Chem. 267, 6137-6141.

4. **Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995).** 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. 95, 1071-1077.

5. **Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997).** Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br.J.Rheum. 36, 1151-1160.

6. **Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992).** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J.Biol.Chem. 267, 22346-22350.

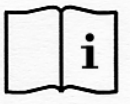
7. **Saxne, T. and Heinegård, D. (1992).** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar;32(3):247]. Br.J.Rheumatol. 31, 583-591.

8. **Sharif, M., Saxne, T., Shepstone, L., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Heinegård, D., and Dieppe, P.A. (1995).** Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 34, 306-310.

9. **Volck, B., Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Garbarsch, C., Price, P.A., Østergaard, M., Østergaard, K., Løvgreen-Nielsen, P., Sonne-Holm, S. and Lorenzen, I. (2001).** Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology.

10. **Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas P.D. and Vignon, E. (2001).** Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann. Rheum. Dis. 60, 619-626.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de simbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Förklaringar till symboler.

	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	Warning. Attention. Atensión. Achtung. Attenzione. Varning.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene.
DIL	Diluent. Diluant.Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert/Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontroll.
Anti-COMP	Anti-COMP reagent, Anti-COMP Reagenz, Anti-COMP Reactivo, Reagente anti-COMP, Anti-COMP reagens

QUESTA E´UNA INSTRUZIONE ABBREVIATA DEL TRATTAMENTO E ESECUZIONE

Uso dei prodotti

Wieslab™ COMP e´un´ kit immunoenzimatico, (ELISA) per la determinazione la quantificazione delle Proteine Matrici Oligomeriche Cartilaginee (COMP) nel siero o nei fluidi sinoviali. Il test si usa come aiuto per la l´osservazione del cambiamento/mutamento del COMP.
Il risultato non deve essere utilizzato per la diagnosi clinica e il trattamento dei pazienti.

Raccolta dei campioni

I Campioni del siero sono piuttosto stabili se usati in un breve periodo e se conservati e maneggiati in adeguato modo. Per periodi lunghi, i campioni dovranno essere conservati ad una temperatura di –20°. Congelamenti e scongelamenti dei campioni del siero hanno una lieve influenza sui livelli del COMP, cio´deve comunque essere evitato in quanto potrebbero verificarsi instabilita´. I campioni del fluido sinoviale sembrano essere maggiormente sensibili alla degradazione.
Evitare di usare campioni che sono itterici, lipenici o emolizzati.
la NCCLS ha stabilito le norme per il corretto posizionamentodei campioni di sanguecimens, (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Avvertenze e precauzioni

- ***I prodotti sono destinati ad uso di ricerca.***
- I componenti del siero umano usati per la preparazione del controllo e la calibratura nel kit sono sono stati testati e risultati negativi alla presenza di anticorpi nel sistema immunitario dei virus 1 & 2 (HIV 1&2), Hepatite C (HCV), epatite B, antigeni superficiali dal metodo approvato FDA. E´pero´da considerare che nessun metodo puo´offrire complete garanzie che agenti dei virus HIV, HCV, Epatite B virus, o altri agenti infettivi siano assenti , tutti i vari campioni e prove devono quindi essere trattati come potenziali vettori di malattie infettive.
- Il Centro per le Malattie Controllo e Prevenzione e l´ Istituto Nazionale per la Salute degli Usa raccomandano che il materiale potenzialmente infettivo sia maneggiato da bio-laboratori a livello di sicurezza 2.
- Tutte le soluzioni contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca evitare che i reagenti entrino in contatto con gli occhi o la pelle.i reagenti contenenti ProClin possono essere irritanti. In caso di contatto lavare subito con acqua abbondante.
- La concentrazione di ASCA in un dato campione puo´variare nei valori a secondo dei vari produttori a causa delle diversita´dei metodi e delle specificita´dei reagenti.
- Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	C1
CONTROL	C2
SUBS	pNPP
Anti-COMP	

Attenzione

Contiene ProClin 300:
Miscela di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P333+313:	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

Materiali o accessori necessari ma non inclusi nel kit
- lettore di micropiastre con filtro 405 nm.
- pipette di precisione con puntali monouso.
- Piastra preincubazione con con 96 pozzetti
- attrezzatura per il lavaggio dei pozzetti/strisce,carta assorbente,provette e timer.

Componenti dell Kit e conservazione dei reagenti
- una cornice con strisce (12x8) rivestiti di COMP. il tutto sigillato in un foglio di alluminio con essiccante.
- 6 Calibratori 600 µL/ognuno, (10, 20, 30, 40, 60, 80 ng/mL), contenenti COMP e diluente sufficenti per 4 curve di calibratura.
- 2 controlli del siero prediluiti.
- 2 x32 mL diluente i.e. tampone campione diluito.
- 8 mL di reagente anti-COMP per la preincubazione.
- 13 mL di di tampone coniugato con fosfatasi alcalina diretti contro il coniglio IgG.
- 13 mL Substrato pNPP.
- 30 mL soluzione di lavaggio concentrata 30x.
- Tutti I reagenti del Kit sono gia´pronti per l´uso escluso la soluzione di lavaggio che deve essere conservata a +2-8° C. Utilizzare solo il numero delle strisce rivestite di COMP che sono necesssarie per il test. Risigillare accuratamente il sacchetto.

PROCEDURA
Tutti i calibratori, i controlli e i campioni devono essere testati in modo doppio.
Tutte le soluzioni devono essere ussate a temperature ambiente.

-IL PRIMO GIORNO- (POMERIGGIO)

Diluzione del siero e preincubazione del primo anticorpo
Diluite i campioni del siero 1/50 col tampone. Diluite il fluido sinoviali 1/500 (i campioni del siero devono essere diluiti 1/30 o maggiore. Consigliamo la diluzione dei campioni del siero 1/50

I fluidi sinoviali devono essere diluiti a 1/200 o maggio. Consigliamo una diluzione di partenza di 1/500.

Pipettate 75 µL dai calibratori C10, C20, C30, C40, C60, C80 e dai controlli C1, C2 e diluite i campioni nella piastra preincubatrice (piastra a fondo rotondo) come dal seguente diagramma.

	1	2	3	4	5
A	C80	C20	S1		
B	C80	C20	S1		
C	C60	C10	S2		
D	C60	C10	S2		
E	C40	C1	etc		
F	C40	C1			
G	C30	C2			
H	C30	C2			

Aggiungete 75 µL di reagente anti COMP in ogni pozzetto. Agitate con una schaker per 5 minuti.
Lasciate incubare per tutta la notte (12 –18 ore) ad una temperatura di circa +4° C.

SECONDO GIORNO
Prima dellúso portare tutte le soluzioni a temperatura ambiente.

Preparazione della soluzione di lavaggio
Diluire 10 mL della soluzione di lavaggio 30x in 290 mL di acqua distillata. Conservata a 2–8° C la soluzione di lavaggio diluita e´stabile fino alla data di scadenza del kit.
Se necessario, ulteriore soluzione di lavaggio, puo´essere preparata sciogliendo 9.0 g NaC1 in 1 L di acqua distillata, aggiungere 0.5 mL di tween e mischiare.

Incubazione nella piastra rivestita di antigeni
1. Trasferite 100µL da ogni pozzetto della piastra di preincubazione nella piastra rivestita di antigeni.
2. Incubate a temperatura ambiente per 60 minuti.

Dopo l´incubazione del campione
Lavare ogni pozzetto 3 volte con la soluzione di lavaggio (circa 300µL/per ogni pozzetto). Riempire e svuotare i pozzetti ogni volta. Dopo l´ultimo lavaggio svuotare e asciugare i pozzeti tasmponando con carta assorbente.

Aggiunta del coniugato
Aggiungere 100 µL di coniugato in ogni pozzetto. Incubate per 60 minuti.

Dopo l´incubazione del coniugato
Lavare come sopra.

Aggiunta del Substrat pNPP
Aggiungere 100 µL della soluzione del substrato pNPP in ogni pozzetto, incubate per 60 minuti (± 10 minuti).
Leggere le assorbenze a 405 nm con un lettore di micropiastre.

Calcolo dei risultati
Calcolate la somma del COMP nei campioni utilizzando l´apposito programma (software). I risultati delle migliori curve sono ottenute utilizzando un algoritmo adattato per fare le curve come spline
Per calcolare i livelli nel siero o in altri campioni, ricordarsi di adattare le diluzioni.

Risultati attesi
I livelli del COMP di 80 donatori di sangue non selezionati di eta´ 22–59 anni sono stati di 1.35 ±0.40 µg/mL (scala 0.99–2.54). Valori normali non sono disponibili per il fluido sinoviale ma normalmente i valori del fluido sono di circa dieci – venti volte maggiori di quelli del siero.
In un campione clinico i fluidi sinoviali del ginocchio, i valori del COMP sono stati da 14 a 48 µg/mL.

References

1. **DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett. 354, 237-240.

2. **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992).** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem. 267, 6132-6136.

3. **Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., and Paulsson, M. (1992).** Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J.Biol.Chem. 267, 6137-6141.

4. **Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995).** 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. 95, 1071-1077.

5. **Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997).** Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br.J.Rheum. 36, 1151-1160.

6. **Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992).** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J.Biol.Chem. 267, 22346-22350.

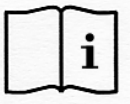
7. **Saxne, T. and Heinegård, D. (1992).** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar;32(3):247]. Br.J.Rheumatol. 31, 583-591.

8. **Sharif, M., Saxne, T., Shepstone, L., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Heinegård, D., and Dieppe, P.A. (1995).** Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 34, 306-310.

9. **Volck, B., Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Garbarsch, C., Price, P.A., Østergaard, M., Østergaard, K., Løvgreen-Nielsen, P., Sonne-Holm, S. and Lorenzen, I. (2001).** Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology.

10. **Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas P.D. and Vignon, E. (2001).** Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann. Rheum. Dis. 60, 619-626.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de simbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Förklaringar till symboler.

	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	Warning. Attention. Atensión. Achtung. Attenzione. Varning.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene.
DIL	Diluent. Diluant.Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert/Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontroll.
Anti-COMP	Anti-COMP reagent, Anti-COMP Reagenz, Anti-COMP Reactivo, Reagente anti-COMP, Anti-COMP reagens

KORTFATTAD SVENSK INSTRUKTION

Produktens användning

Wieslab™ hCOMP analys är en *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA*) för bestämning och kvantifiering av intakt eller fragmenterat humant Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP), en dominerande komponent i broskvävnad. Resultatet är en indikator på hCOMPs omsättning vilket anses reflektera broskvävnadens bioaktivitet.
Resultatet får inte användas för klinisk diagnos eller behandling av patienter.

Provtagning

hCOMP analysen är avsedd för serum och synovialvätska. Tänk på att flera reagens och inte minst serumprov potentiellt kan innehålla infektiösa agens. Analysera inte prov som är ikteriska, lipemiska eller hemolyserade. Värmeinaktiverat prov kan ge ospecifik reaktivitet och bör därför ej analyseras. Prover kan förvaras vid 2-8°C om analys sker inom några dagar Långtidsförvaring skall ske vid -20°C eller kallare. Använd inte frysar med automatisk avfrostning då risk finns att prover töar under avfrostningarna. Prover som förvarats oriktigt kan ge felaktiga resultat. NCCLS har gett ut rekommendationer på hur man förvarar blodprover (Approved Standard-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A, 1990).

Säkerhetsinformation

- ***Produkten får endast användas för forskning.***
- Serum som använts vid preparation av kontroller och kalibratorer har testat negativt för antikroppar mot humant immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatit C (HCV) och hepatit B ytantigen. Tänk dock på att ingen metod kan helt garantera frånvaron av HIV, HCV, hepatit B virus, eller andra infektiösa agens. Alla humana prov måste därför betraktas som potentiellt infektiösa och hanteras med försiktighet.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) och National Institutes of Health (NIH) i USA rekommenderar att potentiellt infektiösa material hanteras i enlighet med Biosafety Level 2.
- Alla lösningar innehåller ProClin 300 som konserveringsmedel. Pipettera aldrig med munnen. Undvik att få reagens eller patientprov direkt på huden. Reagens med ProClin 300 är irriterande och därför skall kontakt med hud och ögon undvikas. I händelse av att reagens kommit i kontakt med hud eller ögon, skölj med stora mängder vatten.
- På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla varuinformationsblad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.

BUF	WASH	30X
DIL		
CONJ		
CAL		

CONTROL	C1
CONTROL	C2
SUBS	pNPP
Anti-COMP	

Varning

Innehåller ProClin 300:
Reaktionsmassa bestående av: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Kan orsaka allergisk hudreaktion.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansikts-skydd.
P302+352:	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P333+313:	Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.

Nödvändig utrustning och material som ej ingår i kittet
- Preinkubationsplatta (96 rundbottnade brunnar)
- Spektrofotometer med filter för 405 nm.
- Precisionspipetter med engångsspetsar.
- Tvättmaskin för mikrotiterplattor, torkpapper, provrör, timer

Ingående reagens och förvaring
- En ram med strips (12x8 brunnar) belagda med humant Cartilage Oligomeric Matrix Protein (hCOMP) och ett lock. Allt förpackat i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.
- 0,6 mL kontroll (C1), humant serum färdigspätt i ”diluent”.
- 0,6 mL kontroll (C2), humant serum färdigspätt i ”diluent”.
- 13 mL konjugatlösning, alkaliskt fosfatas-märkta anti-kanin IgG antikroppar (blå färg).
- 2 x 32 mL spädningslösning ”Diluent”(Dil), PBS (röd färg).
- 8 mL anti-COMP reagens
- 13 mL substratpNPP.
- 30 mL tvättlösning, 30x koncentrerad.
- 6 kalibratorer: 0,6 mL vardera (10, 20, 30, 40, 60, 80 ng/mL) bestående av renat hCOMP i diluent

Alla reagens i kittet är färdiga att använda utom tvättlösningen. Förvara kittet i kyl (+ 2-8°C).
Tag endast ut det antal strips som behövs. Resten skall förvaras i aluminiumpåsen som förvaras tillsluten.

TESTPROCEDUR
Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem. Alla inkubationer skall ske vid rumstemperatur (20-25° C). Använd lock för att undvika avdunstning. Samtliga kalibratorer, kontroller och prov bör analyseras i duplikat.

- DAG 1 (EFTERMIDDAG) -

Provspädning och preinkubation med anti-COMP reagens
1. Späd patientprovet. Rekommenderad serumspädning 1/50. Rekommenderad spädning synovialvätska 1/500.
2. Pipettera 75 µL/brunn i duplikat av följande: Kalibrator C10, C20, C30, C40, C60, C80, Kontroll C1, Kontroll C2, och patientprov (P) enligt nedanstående schema.
3. Tillsätt 75 µL anti-COMP reagens till samtliga brunnar. Mixa 5 minuter. Inkubera över natt (12-18 timmar) vid 4° C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C80	C20	P1									
B	C80	C20	P1									
C	C60	C10	P2									
D	C60	C10	P2									
E	C40	C1	etc									
F	C40	C1										
G	C30	C2										
H	C30	C2										

- DAG 2 -
Alla lösningar skall vara rumstempererade innan man använder dem.

Beredning av tvättlösning
Späd 10 mL av den 30x koncentrerade tvättlösningen med 290 mL destillerat vatten. Den spädda tvättlösningen håller till kittets utgångsdatum om man förvarar den vid 2-8° C. Extra tvättlösning bereds genom att man löser 9 g NaCl i 1,0 L destillerat vatten, tillsätt 0,5 mL Tween 20, blanda.

Inkubation i antigenbelagd platta
1. Överför 100 µL från preinkubationsplattan till antigenplattan.
2. Inkubera 60 minuter i rumstemperatur.

Efter provinkubering / Tillsättning av konjugat
Tvätta 3 gånger med 300 µL tvättlösning/brunn, var noga med att helt tömma och fylla brunnarna i varje tvättcykel. Efter sista tvätten skall alla rester av vätska avlägsnas genom att slå mikrotiterstripsen mot ett absorberande papper.
Tillsätt 100 µL konjugatlösning till varje brunn. Inkubera i 60 minuter.

Efter konjugat inkubering
Tvätta som tidigare.

Tillsättande av substrat pNPP
Tillsätt 100 µL substrat pNPP i varje brunn, inkubera i 60 minuter (± 10 minuter).
Avläs absorbansen i en spektrofotometer vid 405 nm.

Beräkningar
Rita en kalibreringskurva genom att plotta de 6 kalibratorernas OD värden mot deras respektive givna värden. Använd ett beräkningsprogram som t ex spline. Bestäm med ledning av kalibreringskurvan mängden hCOMP i respektive prov. Glöm inte att kompensera för spädningen vid beräkning av mängd i serum eller synovialvätska.

Kvalitetskontroll
C1och C2 kontrollernas värde, se lot certifikatet.
C1 och C2 kontrollerna används för att kontrollera att kittet fungerar tekniskt. Om något/några värden inte faller inom angivet område bör testen ej godkännas och man skall göra om analysen.

Förväntade resultat
I en studie av 80 blodgivare befanns serumnivån av hCOMP vara 1,35 ±0,40 µg/mL (range 0,99 – 2,54). Väl etablerade normala nivåer i synovialvätska finns ej tillgängligt men ligger runt tio till tjugo gånger serumnivån. I ett kliniskt material på synovialvätska från knä uppmättes 14 – 48 µg/mL.

References

1. **DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994).** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett. 354, 237-240.

2. **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992).** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J.Biol.Chem. 267, 6132-6136.

3. **Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., and Paulsson, M. (1992).** Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. J.Biol.Chem. 267, 6137-6141.

4. **Månsson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegård, D., and Saxne, T. (1995).** 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. 95, 1071-1077.

5. **Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997).** Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. Br.J.Rheum. 36, 1151-1160.

6. **Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992).** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J.Biol.Chem. 267, 22346-22350.

7. **Saxne, T. and Heinegård, D. (1992).** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar;32(3):247]. Br.J.Rheumatol. 31, 583-591.

8. **Sharif, M., Saxne, T., Shepstone, L., Kirwan, J.R., Elson, C.J., Heinegård, D., and Dieppe, P.A. (1995).** Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 34, 306-310.

9. **Volck, B., Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Garbarsch, C., Price, P.A., Østergaard, M., Østergaard, K., Løvgreen-Nielsen, P., Sonne-Holm, S. and Lorenzen, I. (2001).** Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology.

10. **Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas P.D. and Vignon, E. (2001).** Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann. Rheum. Dis. 60, 619-626.

Explanation of symbols. L'explication de symboles. La explicación de simbolos. Erklärung der Symbole. La spiegazione di simboli. Forklaring til symboler. Förklaringar till symboler.

	Use-by date. Date de péremption. Fecha de caducidad. Verfallsdatum. Usare entro. Använd före
	Biological risk. Risque biologique. Riesgo biológico. Biologische Gefährdung. Rishio biologico. Biologisk risk.
	Temperature limit. Seuils de températures. Rango de temperature. Temperaturbereich. Limitazioni di temperatura. Förvaringstemperatur.
	Manufacturer. Fabricant. Fabricante. Hersteller. Produttore. Tillverkare.
	Batch code. Numéro de lot. Número de lote. Chargen-Nummer. Numero di lotto. Satsnummer.
	Catalogue number. Référence catalogue. Número de catálogo. Katalog-Nummer. Numero di catalogo. Katalognummer.
	Consult instructions for use. Lire le mode d'emploi. Consulte las instrucciones de uso. Gebrauchsanweisung beachten. Leggere le istruzioni per l'uso. Läs instruktionsmanualen.
	Warning. Attention. Atensión. Achtung. Attenzione. Varning.
	Contains sufficient for 96 tests. Contenu suffisant pour 96 tests. Contenido suficiente para 96 pruebas. Inhalt ausreichend für 96 Tests. Contenuto sufficiente per 96 test. Innehåller tillräckligt för 96 test.

Ag	Antigen. Antigène, Antigeno. Antigene. L'antigene.
DIL	Diluent. Diluant.Diluyente. Probenverdünnungspuffer. Il diluente. Spädningsbuffert.
CONJ	Conjugate. Conjugué. Conjugado. Conjugato. Konjugat.
BUF WASH 30X	Washsolution 30x conc. Solution lavage conc. 30x. Solución de lavado conc. 30x. Waschpuffer 30x konc. Soluzione di lavaggio 30x conc. Vaskebuffert/Tvättbuffert 30x konc.
SUBS pNPP	Substrate pNPP. pNPP Substrat. Sustrato pNPP. Substrato pNPP. Substrat pNPP.
CAL X	Calibrator. Etalon. Calibrador. Calibratore. Kalibrator.
CONTROL X	Control. Kontrolle. Contrôle. Controllo. Kontroll.
Anti-COMP	Anti-COMP reagent, Anti-COMP Reagenz, Anti-COMP Reactivo, Reagente anti-COMP, Anti-COMP reagens

EURO DIAGNOSTICA AB
Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
E-mail: info@eurodiagnostica.com
www.eurodiagnostica.com