

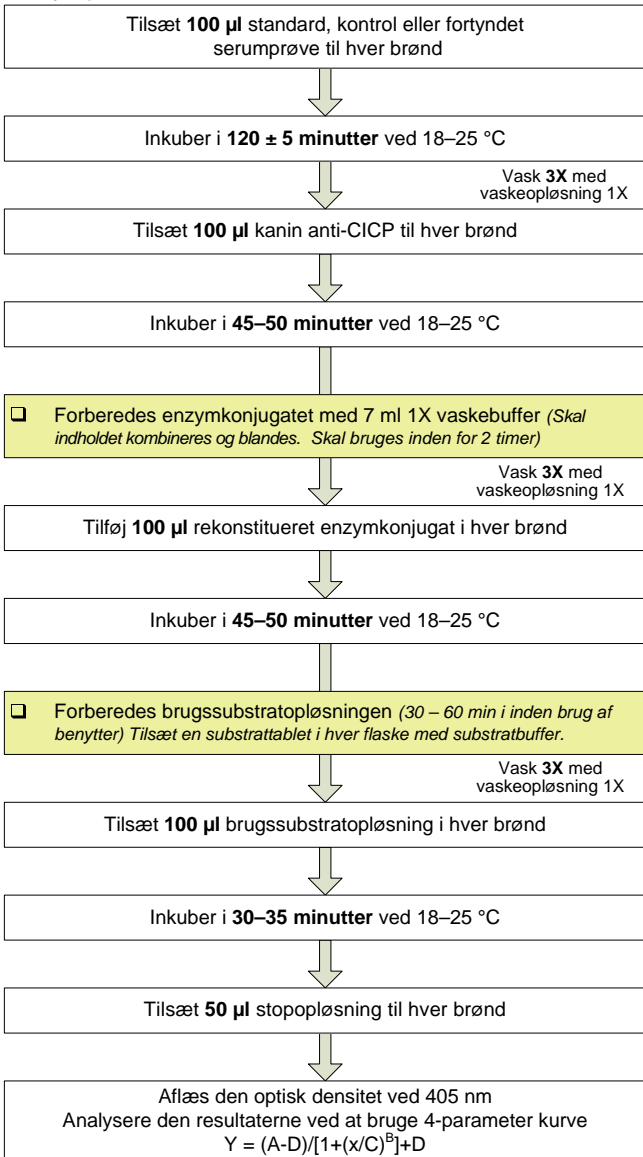
En enzymimmunoanalyse til kvantitativ måling af C-terminal propeptid af kollagen type I (CICP) i serum

MicroVue™ CICP EIA Opsummering

Klargøring af Reagens og Prøveeksemplar

- Fortynd 10X vaskebuffer 1:10 med deioniseret vand
- Fortynd serumprøverne 1:12 med analysebuffer (dvs. 25 µl serum + 275 µl analysebuffer)

Analyseproceduren



OPSUMMERING OG FORKLARING

Kollagen, et tredobbelt helixmolekyle der danner den fibrøse struktur i alt bindevæv, syntetiseres som prokollagen, et større precursor-molekyle. Prokollagen består af modent kollagen med ekstensionspeptider ved både amino- og carboxy-termini. Disse ekstensions-

peptider eller propeptider spaltes fra kollagenmolekylet med specifik protease før inkorporering af kollagen til en voksende kollagenfibril. Udløsningen af disse peptider ind i cirkulationen giver en støkiometrisk repræsentation af kollagenproduktionen.

MicroVue CICP EIA-kittet leverer en kvantitativ metode til bestemmelse af niveauer for CICP (C-terminal af kollagen type I) i serum. CICP-niveauer er indikative for kollagenproduktion *in vivo*. Niveauer af kollagen type I, som er den primære organiske knoglebestanddel, er blevet forbundet med knoglevækst og -dannelse. Forhøjede CICP-niveauer er blevet påvist i sygdomme, der er relateret til høje niveauer af knogleresorption, herunder Pagets knoglesygdom, hyperthyroidisme, primær hyperparathyroidisme og renal osteodystrofi. I visse tilfælde er forhøjede CICP-niveauer også blevet dokumenteret i tidlig menopause. Lave CICP-niveauer er blevet påvist i børn med væksthormonmangel.

PROCEDURENS PRINCIP

MicroVue CICP-analysen er en sandwichenzym-immunoanalyse i et mikrotiter-pladeformat, der anvender et monoklonalt anti-CICP antistof, som pladen er belagt med, kanin anti-CICP antiserum, gede anti-kanin alkalisk fosfatasekonjugat, og et pNPP-substrat til kvantificering af CICP i humant serum.

LEVEREDE MATERIALER OG REAGENSER

96 analyser for C-terminal propeptid af kollagen type I i serum

MicroVue-CICP EIA-kit indeholder følgende:

A

B CICP-standarder: **Dele 4138 – 4143** **0,75 ml hver**

C Standard A-F, klar til brug, se Analyseattest for koncentration

D CICP oprenset fra humane fibroblastceller i en bufferopløsning, der indeholder nonionisk detergent, stabilisator og natriumazid

E (0,05 %) som konserveringsmiddel

F

L Lave kontrol **Dele 4144** **0,75 ml**

CICP oprenset fra humane fibroblastceller i en bufferopløsning, der indeholder nonionisk detergent, stabilisator og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel

H Høje kontrol **Dele 4145** **0,75 ml**

CICP oprenset fra humane fibroblastceller i en bufferopløsning, der indeholder nonionisk detergent, stabilisator og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel

1 Coatede strips **Del 4672** **12 stk.**

Renset monoklonalt anti-CICP museantistof adsorberet på stripbrønde

2 Stopopløsning **Del 4702** **15 ml**

0,5N NaOH

- | | | | |
|----------|--|-----------------|--------------------|
| 3 | 10X vaskebuffer | Del 4703 | 55 ml |
| | Nonionisk detergent i en bufferopløsning, der indeholder natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel | | |
| 4 | Analysebuffer | Del 4150 | 20 ml |
| | En bufferopløsning, der indeholder nonionisk detergent, stabilisator og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel | | |
| 5 | Substratbuffer | Del 4705 | 3 x 10 ml |
| | En diethanolamin- og magnesiumkloridopløsning, der indeholder natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel | | |
| 6 | Substrattabletter | Del 0012 | 3 x 20 mg |
| | p-Nitrofenylfosfat | | |
| 7 | Enzymkonjugat | Del 4149 | 3 hætteglas |
| | Frysetørret gede anti-kanin IgG-antistof konjugeret til alkalisk fosfatase, som indeholder buffersalte og stabilisatorer | | |
| 8 | Kanin anti-CICP | Del 4148 | 14 ml |
| | Kanin polyklonal anti-CICP-antistof i en bufferopløsning, der indeholder nonionisk detergent, stabilisator og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel | | |

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDLEVEREDE MATERIALER

- Mikropipetter til afgivelse af 25–300 µl
- Egnede enheder til væskemåling af 7–300 ml
- Glas til fortynding af prøver
- Beholder til vaskebufferfortynding
- Demineraliseret eller destilleret vand
- Pladelæser, der kan aflæse ved 405 nm
- Kalibreringskurvetilpasnings-software med 4 parametre

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Kun til forskningsbrug i USA. Må ikke anvendes til diagnostiske procedurer (kun i USA).
2. Prøverne skal behandles som potentielt biologisk risikomateriale. Følg gældende retningslinier for omgang med biologisk risikomateriale ved håndtering af dette kit og alle patientprøver.
3. Brug egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen-/ansigtsskærm ved håndtering af dette kit.
4. Brug de leverede reagenser som en integreret enhed, inden udløbsdatoen på pakningens etiket.
5. Opbevar analysereagenserne som anvist.
6. Brug ikke coatede strips, hvis posen er punkteret.
7. 0,5N NaOH anses for at være ætsende og kan medføre irritation af hud. Må ikke indtages. Undgå kontakt med hud, øjne og tøj. Hvis der sker kontakt, skylles med vand. Ved indtagelse tilkaldes læge.
8. Natriumazid anvendes som konserveringsmiddel. Utsigtet kontakt med eller indtagelse af buffere, der indeholder natriumazid, kan medføre irritation af hud, øjne eller mund. Brug kun bufferne til det tilsigtede formål, og undgå kontakt med syrer. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberinstallationer og danne højeksplosive metalazider. Efter bortskaffelse skylles med rigeligt vand for at undgå azidophobning.
9. Substratbufferen indeholder diethanolamin og kan forårsage irritation af øjne og/eller hud ved kontakt i længere tidsrum. Berørte områder skal omgående vaskes med vand og sæbe.

10. Brug af multikanalpipetter eller repeat-pipetter anbefales for at sikre en rettidig tilsætning af reagenser.
11. Tilsæt prøver og standarder præcist for at sikre en nøjagtig prøveudmåling. Foretag omhyggelig afpipettering og kun ved hjælp af kalibreret udstyr.
12. Korrekt indsamling og opbevaring af testprøverne er vigtig for at opnå nøjagtige resultater (se *INDSAMLING OG OPBEVARING AF PRØVER*).
13. Undgå mikrobiel eller krydskontaminering af prøver eller reagenser.
14. Test hver prøve i to eksemplarer.
15. Mikrobrøndene må ikke anvendes til mere end én test.
16. Anvendelse af andre inkuberingstider og -temperaturer end dem, der er anført i afsnittet Procedure, kan medføre fejlagtige resultater.
17. Mikrobrøndene må ikke tørre, når analysen er begyndt.
18. Undgå at skrabe eller berøre brøndenes bund, når væsken fjernes fra mikrobrøndene.
19. Varme-inaktiverede, hyperlipæmiske eller kontaminede prøver kan give fejlagtige resultater.
20. For at undgå aerosoldannelse under vaskeprocessen, skal der bruges et instrument til at aspirere vaskeopløsningen ned i en flaske med blegemiddel til husholdningsbrug.
21. Denne analyse kan udføres med enhver valideret vaskemetode.
22. Beholdere og ikke anvendt indhold bortskaffes i overensstemmelse med de nationale, regionale og lokale bestemmelser.

KLARGØRING AF REAGENS

Afbalancer reagenserne til 18–25 °C inden brug.

Coatede strips

Fjern brøndstripholderen, og tag det nødvendige antal coatede strips ud af posen (se tabellen i afsnittet *ANALYSEPROCEDUREN*). Sørg for, at posen, med evt. ubrugte strips, lukkes fuldstændigt igen.

Vaskebuffer

Forbered den nødvendige mængde 1X vaskebuffer (se tabel) ved at fortynde 10X vaskebuffer 1:10 med demineraliseret vand. Opbevares ved 18–28 °C. 1X vaskebuffer skal bruges inden for 21 dage efter forberedelse.

Enzymkonjugat

Forbered enzymkonjugat inden for 2 timer før brugen. Rekonstituer hvert nødvendigt prøveglas med enzymkonjugat (se tabel) med 7 ml 1X vaskebuffer. Lad pillen opløses fuldstændigt. Resterende enzymkonjugat skal kasseres efter brug.

Brugssubstratopløsning

Forbered en brugssubstratopløsning inden for en time før brugen. Tilsæt en substrattablet i hver nødvendig flaske med substratbuffer ved en temperatur på 18–25 °C (se tabel). Lad tabletten(-erne) opløses i 30–60 minutter. Ryst flasken(-erne) kraftigt for at sikre fuldstændig opblanding. Resterende brugssubstratopløsning skal kasseres efter brug.

OPBEVARING

Opbevar kittet ved 2–8 °C. Opbevar ubrugte reagenser ved 2–8 °C. Opbevar 1X vaskebuffer (10X fortyndet) ved 18–28 °C.

PRØVEUDTAGNING OG FORBEREDELSE

Udtag serum vha. standardteknik for venepunktur, uden anti-koagulanter, og sådan at hæmolyse undgås. Lad blodet størkne, og udskil serum ved centrifugering. Opbevar serum i køleskab (2–8 °C) ved opbevaring i mindre end 5 dage eller frys ved ≤ -20 °C ved længere opbevaring. Udsæt ikke prøverne for mere end 3 fryse-/optøningscykler.

ANALYSEPROCEDUREN

Læs hele indlægssedlen inden analysen startes.

Se *KLARGØRING AF REAGENS*, inden der fortsættes.

Bestem, hvor meget reagens, der er påkrævet til det antal strips, der skal anvendes.

Antal strips	4	6	8	12
Antal prøver (testet i to eksemplarer)	8	16	24	40
Enzymkonjugat (hætteglas)	1	1	2*	2*
Substratbuffer (flaske)	1	1	2*	2*
1X vaskebuffer (ml)	100	150	200	300

* Når der skal bruges mere end en flaske eller et hætteglas, skal indholdet kombineres og blandes inden brug.

Prøvefortynding/inkubering

- Fortynd serumprøverne 1:12 med analysebuffer (dvs. 25 µl serum + 275 µl analysebuffer).
- Lad posen med de coatede strips komme op på 18–25 °C før åbning. Udtag brøndstrip-holderen og det nødvendige antal coatede strips fra posen (se tabellen). Kontroller, at posen med evt. ubrugte strips lukkes fuldstændigt igen, og at den indeholder et tørremiddel.
- Placer det ønskede antal coatede strips i brøndstrip-holderen lige før brug. Navngiv stripsene for at forhindre en sammenblanding i tilfælde af, at de utilsigtet fjernes fra brøndstrip-holderen.
- Tilsæt 100 µl standard, kontrol eller fortyndet serumprøve til hver brønd med coatede strips. Dette trin skal afsluttes inden for 30 minutter.
- Inkuber i 120 ± 5 minutter ved 18–25 °C.

Vasketrin (1)

- Forbered den nødvendige mængde 1X vaskebuffer (se tabel) ved at fortynde 10X vaskebufferkoncentrat 1:10 med demineraliseret vand. Opbevares ved 18–28 °C. 1X vaskebuffer skal bruges inden for 21 timer efter forberedelse.
- Stripsene inverteres/tømmes manuelt. Tilsæt mindst 300 µl 1X vaskebuffer i hver brønd og inverter/tøm strimlerne manuelt. Gentag to gange, så vaskeproceduren foretages tre gange i alt. Tør stripsene grundigt med papirservietter efter den sidste vask.

Inkubation af antistof

- Tilsæt 100 µl kanin anti-CICP til hver brønd.
- Inkuber i 45–50 minutter ved 18–25 °C.
- Under inkuberingen forberedes enzymkonjugatet. Rekonstituer hvert nødvendigt prøveglas med enzymkonjugat (se tabel) med 7 ml 1X vaskebuffer. Blandes grundigt. Skal bruges inden for 2 timer.

Vasketrin (2)

- Stripsene inverteres/tømmes manuelt. Tilsæt mindst 300 µl 1X vaskebuffer i hver brønd og inverter/tøm strimlerne manuelt. Gentag to gange, så vaskeproceduren foretages tre gange i alt. Tør stripsene grundigt med papirservietter efter den sidste vask.

Inkubation af enzymkonjugat

- Tilføj 100 µl rekonstitueret enzymkonjugat i hver brønd.
- Inkuber i 45–50 minutter ved 18–25 °C.
- Under inkuberingen forberedes brugssubstratopløsningen. Tilsæt en substrattablet i hver nødvendig flaske med substratbuffer ved en temperatur på 18–25 °C (se tabel). Lad tabletten(-erne) opløses i 30–60 minutter. Ryst flasken(-erne) kraftigt for at sikre fuldstændig opblanding. Skal bruges inden for 1 time.

Vasketrin (3)

- Stripsene inverteres/tømmes manuelt. Tilsæt mindst 300 µl 1X vaskebuffer i hver brønd og inverter/tøm strimlerne manuelt. Gentag to gange, så vaskeproceduren foretages tre gange i alt. Tør stripsene grundigt med papirservietter efter den sidste vask.

Substratinkubation

- Tilsæt 100 µl brugssubstratopløsning i hver brønd.
- Inkuber i 30–35 minutter ved 18–25 °C. Hvis der ikke kan opretholdes en stuetemperatur på mellem 18–25 °C, og en absorptions på > 2,0 ikke er forenelig med pladelæseren, skal udviklingen af substrat i standard F-brøndene overvåges. Reaktionen skal standses, når den optiske densitet når 1,2–1,5, hvorefter stripsene aflæses.

Stop/aflæs

- Tilsæt 50 µl stopopløsning til hver brønd for at standse reaktionen.
- Aflæs den optiske densitet ved 405 nm. Sørg for, at der ikke findes store bobler i brøndene, og at bunden af stripsene er ren. Strips skal aflæses inden for 15 minutter efter tilsætning af stopopløsningen.
- Der kan anvendes kvantificeringssoftware med en ligning for kurvetilpasning med 4 parametre (se nedenfor) for at analysere resultaterne for MicroVue CICP-analysen.
Ligning: $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$
- Bestem koncentrationen af prøver og kontroller ud fra standardkurven.
Fortynd prøver større end 80 ng/ml i analysebuffer, og test igen. Kontrolværdierne skal ligge inden for det område, der er angivet i Analysecertifikatet, der leveres med kittet.

KVALITETSKONTROL

Analysecertifikatet i dette kit er lotspecifikt og skal anvendes til at bekræfte, at resultater opnået i laboratoriet svarer til dem, der er opnået hos Quidel Corporation. De optiske densitetsværdier er opgivet i leverancen og skal kun opfattes som vejledende. Resultater opnået i laboratoriet kan variere.

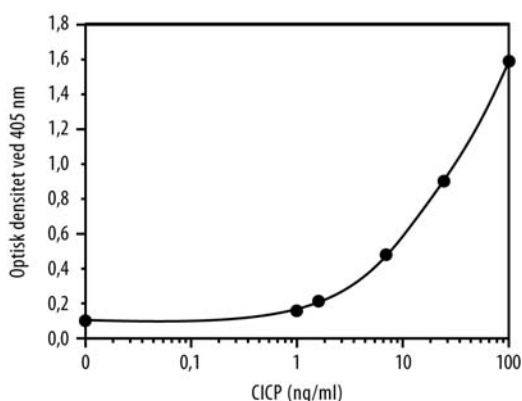
Der er diverse kvalitetskontrolområder til rådighed. Kontrolværdierne har til formål at verificere validiteten af kurve- og prøveresultaterne. Hvert laboratorium skal etablere egne parametre for acceptable analysegrænser. Hvis kontrolværdierne IKKE ligger inden for laboratoriets acceptable grænseværdier, skal analyseresultaterne betragtes som tvivlsomme, og prøverne skal gentages.

Hvis den optiske densitet for MicroVue CICIP Standard F er mindre end 0,8, skal resultaterne anses for tvivlsomme og prøverne skal gentages.

FORTOLKNING AF RESULTATER

Prøveresultater skal korrigeres for den færdige fortynding. Hvis prøven blev fortyndet 1:12, skal ng/ml-værdien multipliceres med 12 for at få det endelige resultat af serum CICIP i ng/ml.

Repræsentativ standardkurve



VÆRDIEKSEMPLER

I vores undersøgelse af 279 voksne over 25 år varierede de opnåede værdier fra MicroVue CICIP kitted fra 69 til 163 ng/ml. I vores undersøgelse af 370 børn i alderen 4–18 år varierede de opnåede værdier fra 110 til 966 ng/ml, med et gennemsnit på 326 CICIP ng/ml.

Værdierne kan være påvirket af faktorer såsom vækst, lav østrogenproduktion, lavt kalciumindtag eller manglende fysisk aktivitet. Østrogenmangel i postklimakterielle kvinder kan medføre forhøjet knogleresorption, og dermed kollagenproduktion. Hvert laboratorium bør etablere sit eget referenceinterval.

TESTENS YDEEVNE

Antistoffernes specificitet

Anti-CICIP antistoffer er hævet mod CICIP udledt fra humane fibroblastceller i kultur. Antistofferne demonstrerer 100 % krydsreaktivitet med CICIP i humant serum.

Detekteringsgrænse

Minimumsgrænsen for analytisk påvisning via MicroVue CICIP-analysen er 0,2 ng/ml, hvilket bestemmes af den øvre 3 SD-grænse i et standardstudium med en standard på nul.

Præcision

Præcision under og mellem kørsler blev bestemt ved at analysere tre serumprøver. Typiske resultater angives herunder.

CICP (ng/ml)	Under kørsel ¹ C.V. %	Mellem kørsler ² C.V. %
80,8	6,8	7,0
98,1	5,5	7,2
296,7	6,6	5,0

¹ n = 20 replikater ² n = 3 i 3 kørsler

Recovery - linearitet

Lineariteten blev bestemt ved at foretage seriel fortynding af prøver og sammenligne konstaterede værdier med forventede værdier. Typiske resultater angives herunder.

Prøve	Fortyndingsfaktor	Observeret (ng/ml)	Forventet (ng/ml)	Recovery (%)
1	1:12	6,90	–	–
	1:24	3,50	3,45	101
	1:48	1,74	1,72	101
2	1:12	13,26	–	–
	1:24	6,56	6,63	99
	1:48	3,49	3,32	105
3	1:12	20,88	–	–
	1:24	10,43	10,44	100
	1:48	5,57	5,22	107

Recovery - Spike recovery

Værdien efter genopretning blev bestemt ved at tilsætte kendte mængder rensed CICIP i serumprøver med forskellige niveauer af endogent CICIP. Typiske resultater angives herunder.

Prøve	Endogent (ng/ml)	Tilsat (ng/ml)	Observeret (ng/ml)	Recovery (%)
1	9,09	13,24	22,28	100
		31,77	45,96	102
2	10,34	13,10	13,00	97
		32,71	43,05	96
3	12,43	13,24	22,28	100
		31,77	41,55	102

ASSISTANCE

For serviceydelser uden for USA kontaktes den lokale forhandler. Yderligere information om Quidel, vores produkter og vore distributører kan findes på www.quidel.com.

REFERENCER

1. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
2. Melkko J, Niemi S, Risteli J. Radioimmunoassay of the carboxy terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin. Chem.* 1990;36:1328-1332.
3. Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone: Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone. Miner. Res.* 1987;2:427-436.
4. Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Di Nero G. Serum levels of carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in healthy children from first year of life to adulthood and in metabolic bone diseases. *Eur. J. Pediatr.* 1992;151:764-768.
5. Simon LS, Krane SM, Wortman PD, Krane IM, Kovitz KL. Serum levels of type I and III procollagen fragments in Paget's disease of bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984;58:110-120.
6. Trivedi P, Risteli J, Risteli L, Hindmarsh PC, Brook CG, Mowat AP. Serum concentrations of type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. *Pediatr. Res.* 1991;30:276-280.
7. Winterbottom N, Vernon S, Freeman K, Daniloff GY, Garner P, Seyedin S. A serum immunoassay for the C-terminal propeptide of type I collagen. *J. Bone. Miner. Res.* 1993;8:S341. (abst)

GLASSET



Se brugsanvisninger CDROM

REF 8003 – **MICROVUE** C1CP EIA Kit
Bone Health



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA | www.quidel.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany