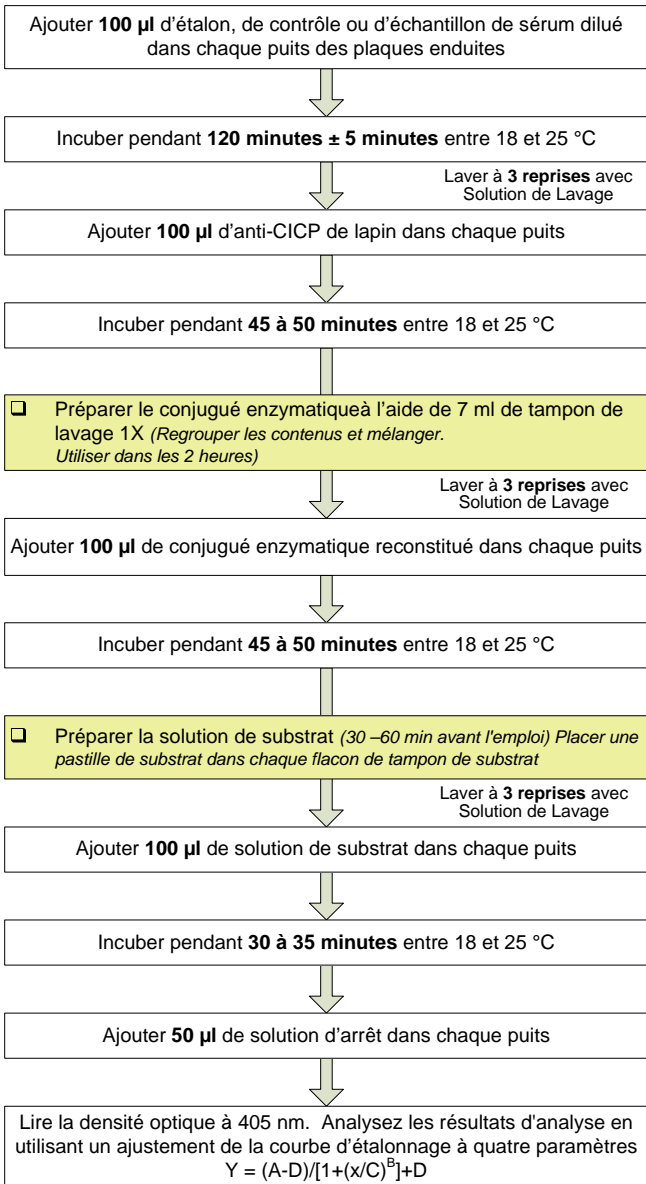


MicroVue™ CICP EIA Sommaire

Préparation de Réactif et d'Échantillon

- Diluer Tampon de Lavage 10X 1:10 avec de l'eau désionisée
- Diluer les échantillons de sérum à 1:12 avec le tampon d'essai (ex.: 25µl de sérum + 275µl de tampon d'essai)

Procédure de l'Essai



RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La molécule de collagène à triple hélice, qui constitue un cadre fibreux regroupant tous les tissus conjonctifs, est synthétisée sous la forme de procollagène, molécule précurseur plus grosse. Le procollagène est composé de

collagène mature avec des peptides d'extension au niveau des amino et carboxy-terminaux. Ces peptides d'extension, ou propeptides, sont clivés à partir de la molécule de collagène par des protéases spécifiques avant l'incorporation de collagène dans une fibrille de collagène en développement. La libération de ces peptides dans la circulation sanguine fournit une représentation stœchiométrique de la production de collagène.

L'essai immunoenzymatique MicroVue CICP permet de quantifier le CICP (C-terminal du collagène de type I) dans le sérum. Les niveaux de CICP indiquent la production *in vivo* de collagène. En tant que constituant organique primaire de l'os, les niveaux de collagène de type I ont été liés à la croissance et à la formation osseuse. Des niveaux élevés de CICP ont été observés dans des maladies associées à des niveaux élevés de renouvellement des cellules osseuses, dont la maladie osseuse de Paget, l'hyperthyroïdie, l'hyperparathyroïdie primaire et l'ostéodystrophie rénale. Dans certains cas, des niveaux élevés de CICP ont également été signalés en début de ménopause. Des niveaux faibles de CICP ont été observés chez les enfants présentant un déficit d'hormones de croissance.

PRINCIPE DU PROCÉDÉ

L'essai MicroVue CICP est un essai immunoenzymatique de type sandwich dans une plaque de microtitrage enduite d'un anticorps anti-CICP monoclonal et utilisant un anti-sérum anti-CICP de lapin, un conjugué de phosphatase alcaline anti-lapin de chèvre et un substrat pNPP pour quantifier le CICP dans le sérum humain.

RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

96essais pour le propeptide du C-terminal du collagène de type I sérique

Le kit d'essai immunoenzymatique MicroVue CICP contient les éléments suivants:

- A** Étalons CICP : Réf. 4138 – 4143 0,75 ml chacun
- B** Standards A-F, prêts à l'emploi, les concentrations sont indiquées sur la Certificat d'analyse
- C** indiquées sur la Certificat d'analyse
- D** CICP purifié provenant de fibroblastes humains dans une solution tamponnée contenant du détergent non ionique, un stabilisant et de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur
- E** tamponnée contenant du détergent non ionique, un stabilisant et de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur
- F** de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur
- L** Contrôle Bas Réf. 4144 0,75 ml
CICP purifié provenant de fibroblastes humains dans une solution tamponnée contenant du détergent non ionique, un stabilisant et de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur
- H** Contrôle Haut Réf. 4145 0,75 ml
CICP purifié provenant de fibroblastes humains dans une solution tamponnée contenant du détergent non ionique, un stabilisant et de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur

- | | | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| 1 | Plaques enduites
Anticorps anti-CICP monoclonal murin purifié adsorbé dans les puits | Réf. 4672 | 12 chacun |
| 2 | Solution d'arrêt
0,5 N NaOH | Réf. 4702 | 15 ml |
| 3 | Tampon de lavage 10X
Détergent non ionique dans une solution tamponnée contenant de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur | Réf. 4703 | 55 ml |
| 4 | Tampon d'essai
Une solution tamponnée contenant du détergent non ionique, un stabilisant et de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur | Réf. 4150 | 20 ml |
| 5 | Tampon de substrat
Une solution de diéthanolamine et de chlorure de magnésium contenant de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur | Réf. 4705 | 3 x 10 ml |
| 6 | Substrat en comprimés
phosphate de p-nitrophényl | Réf. 0012 | 3 x 20 mg |
| 7 | Conjugué enzymatique
Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin, lyophilisé, conjugué à de la phosphatase alcaline, contenant des sels de tampon et des stabilisants | Réf. 4149 | 3 flacons |
| 8 | Anti-CICP de lapin
Anticorps anti-CICP polyclonal de lapin dans une solution tamponnée contenant un détergent non ionique, un stabilisant et de l'azide de sodium (0,05 %) comme conservateur | Réf. 4148 | 14 ml |

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Micropipettes pour distribuer de 25 à 300 µl
- Équipement de laboratoire adapté à la mesure de 7 à 300 ml de liquide
- Tubes pour la dilution des échantillons
- Récipient pour la dilution de tampon de lavage
- Eau déionisée ou distillée
- Lecteur de plaque pouvant lire des mesures à 405 nm
- Logiciel de gestion de la courbe d'étalonnage à 4 paramètres

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Réservé à la recherche uniquement dans É.-U. Ne pas utiliser à des fins diagnostiques (É.-U. uniquement).
2. Traiter les échantillons comme des matériaux présentant un risque biologique potentiel. Suivre les précautions standard lors de la manipulation du contenu de ce kit et de tous les échantillons de patients.
3. Porter un vêtement, des gants et un appareil de protection des yeux /du visage appropriés lors de la manipulation du contenu de ce kit.
4. Utiliser les réactifs fournis en une seule livraison avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
5. Stocker les réactifs de l'essai selon les indications.
6. Ne pas utiliser de plaques enduites si la poche a été percée.
7. La solution d'arrêt (0,5 N NaOH) est considérée comme corrosive et peut provoquer une irritation de la peau. Ne pas ingérer. Éviter le contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, laver à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.

8. L'azoture de sodium est utilisé comme conservateur. Tout contact ou toute ingestion accidentelle de tampons contenant de l'azide de sodium peut provoquer une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Utiliser les tampons uniquement à des fins prévues et éviter le contact avec les acides. L'azide de sodium peut réagir avec les conduites en plomb et en cuivre pour former des azides métalliques très explosifs. Lors de la mise au rebut, rincer à grande eau pour éviter une accumulation d'azides.
9. Le tampon de substrat contient du 2,2'-iminodiéthanol et peut causer des irritations aux yeux et/ou sur la peau en cas de contact prolongé. Les zones ayant été en contact avec le produit doivent être rincées immédiatement à l'eau et au savon.
10. L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pipetteurs est recommandée pour assurer la distribution rapide des réactifs.
11. Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les étalons avec précision. Pipeter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
12. Il est essentiel de prélever et de conserver les échantillons avec soin pour obtenir des résultats corrects (voir la section *PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS*).
13. Éviter toute contamination microbienne ou croisée des échantillons ou des réactifs.
14. Tester chaque échantillon en double.
15. Ne pas réutiliser un micropuits pour un deuxième test.
16. Le non-respect des durées et températures d'incubation indiquées dans la *PROCÉDÉ DE L'ESSAI* est susceptible de provoquer des résultats erronés.
17. Ne pas laisser sécher les micropuits quand l'essai est commencé.
18. Ne pas gratter ni toucher le fond des puits lors de l'élimination du liquide hors des micropuits.
19. Des échantillons inactivés par la chaleur, hyperlipémiques ou contaminés, risquent de faire aboutir à des résultats inexacts.
20. Afin d'éviter la production d'aérosols pendant le lavage, utiliser un appareil pour aspirer le liquide de lavage et le déverser directement dans un flacon contenant de l'eau de Javel.
21. Cet essai peut être effectué avec n'importe quelle méthode de lavage validée.
22. Éliminer les récipients et leur contenu inutilisés conformément aux dispositions réglementaires nationales et locales.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

S'assurer que les réactifs sont entre 18 et 25 °C avant utilisation.

Plaques enduites

Sortir le cadre des puits et le nombre de plaques enduites requis de la poche (voir tableau de la section *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*). S'assurer que la poche contenant toutes les plaques inutilisées est complètement fermée.

Tampon de lavage

Préparer la quantité de tampon de lavage 1X requise (voir tableau) en diluant le tampon de lavage 10X à 1:10 avec de l'eau déionisée. Stocker entre 18 et 28 °C. Utiliser le tampon de lavage 1X dans les 21 jours suivant sa préparation.

Conjugué enzymatique

Préparer le conjugué enzymatique dans les 2 heures précédant son utilisation. Reconstituer chaque flacon de conjugué enzymatique requis (voir tableau) à l'aide de 7 ml de tampon de lavage 1X. Laisser le pellet se dissoudre complètement. Jeter le restant de conjugué enzymatique après utilisation.

Solution de substrat active

Préparer la solution de substrat 1 heure avant utilisation. Placer une pastille de substrat dans chaque flacon requis de tampon de substrat entre 18 et 25 °C (voir tableau). Laisser la/les pastille(s) se dissoudre pendant 30 à 60 minutes. Secouer le(s) flacon(s) énergiquement pour mélanger complètement. Jeter le reste de la solution de substrat active après utilisation.

CONSERVATION

Conserver le kit entre 2 et 8 °C.

Conserver les réactifs inutilisés entre 2 et 8 °C.

Conserver le tampon de lavage 1X (10X dilué) entre 18 et 28 °C.

PRÉPARATION ET PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélever les échantillons de sérum en utilisant une technique de veinopuncture standard, sans anti-coagulants et d'une manière visant à éviter l'hémolyse. Attendre que le sang coagule et séparer le sérum par centrifugation. Stocker le sérum au réfrigérateur entre (2 et 8 °C) pour une conservation inférieure à 5 jours, ou congelé à -20 °C minimum pour une conservation plus longue. Ne pas soumettre l'échantillon plus de 3 fois à des cycles de congélation/décongélation.

PROCÉDÉ DE L'ESSAI

Lire la notice produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.

Voir la partie *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* avant de poursuivre.

Déterminer la quantité de chaque réactif nécessaire pour le nombre de plaques à utiliser.

Nombre de plaques	4	6	8	12
Nombre d'échantillons (testés en double)	8	16	24	40
Conjugué enzymatique (flacon)	1	1	2*	2*
Tampon de substrat (flacon)	1	1	2*	2*
Tampon de lavage 1X (ml)	100	150	200	300

* Lorsque plus d'un flacon ou d'une fiole est utilisé, regrouper les contenus et mélanger avant d'utiliser.

Dilution/Incubation de l'échantillon

1. Diluer les échantillons de sérum à 1:12 avec le tampon d'essai (ex. : 25 µl de sérum + 275 µl de tampon d'essai).

2. Laisser la poche de plaques enduites atteindre 18 à 25 °C avant de l'ouvrir. Sortir le cadre des puits et le nombre requis de plaques enduites de la poche (voir tableau). S'assurer que la poche contenant les bandes non utilisées est totalement fermée hermétiquement et contient du dessiccant.
3. Placer le nombre de plaques enduites désiré dans le cadre des puits juste avant utilisation. Libeller les plaques pour éviter de les confondre en cas de retrait accidentel du support des puits.
4. Ajouter 100 µl d'étalon, de contrôle ou d'échantillon de sérum dilué dans chaque puits des plaques enduites. Cette étape doit être réalisée dans les 30 minutes.
5. Incuber pendant 120 minutes ± 5 minutes entre 18 et 25 °C.

Étape de lavage (1)

6. Préparer la quantité de tampon de lavage 1X requise (voir tableau) en diluant du concentré de tampon de lavage 10X à 1:10 avec de l'eau déionisée. Stocker entre 18 et 28 °C Utiliser le tampon de lavage 1X dans les 21 jours suivant sa préparation.
7. Retourner/vider manuellement les plaques. Ajouter au moins 300 µl de tampon de lavage 1X dans chaque puits et retourner/vider manuellement les bandes. Répéter cette opération deux fois de plus pour arriver à un total de trois lavages. Décanter énergiquement les plaques à sec sur des essuie-tout après le dernier lavage.

Incubation de l'anticorps

8. Ajouter 100 µl d'anti-CICP de lapin dans chaque puits.
9. Incuber pendant 45 à 50 minutes entre 18 et 25 °C.
10. Préparer le conjugué enzymatique pendant l'incubation. Reconstituer chaque flacon de conjugué enzymatique requis (voir tableau) à l'aide de 7 ml de tampon de lavage 1X. Bien mélanger. Utiliser dans les 2 heures qui suivent.

Étape de lavage (2)

11. Retourner/vider manuellement les plaques. Ajouter au moins 300 µl de tampon de lavage 1X dans chaque puits et retourner/vider manuellement les bandes. Répéter cette opération deux fois de plus pour arriver à un total de trois lavages. Décanter énergiquement les plaques à sec sur des essuie-tout après le dernier lavage.

Incubation du conjugué enzymatique

12. Ajouter 100 µl de conjugué enzymatique reconstitué dans chaque puits.
13. Incuber pendant 45 à 50 minutes entre 18 et 25 °C.
14. Préparer la solution de substrat pendant l'incubation. Placer une pastille de substrat dans chaque flacon requis de tampon de substrat entre 18 et 25 °C (voir tableau). Laisser la/les pastille(s) se dissoudre pendant 30 à 60 minutes. Secouer le(s) flacon(s) énergiquement pour mélanger complètement. Utiliser dans l'heure qui suit.

Étape de lavage (3)

15. Retourner/vider manuellement les plaques. Ajouter au moins 300 µl de tampon de lavage 1X dans chaque puits et retourner/vider manuellement les bandes. Répéter cette opération deux fois de plus pour arriver à un total de trois lavages. Décanter énergiquement les plaques à sec sur des essuie-tout après le dernier lavage.

Incubation du substrat

16. Ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits.
17. Incuber pendant 30 à 35 minutes entre 18 et 25 °C. Si la température de la pièce ne peut être maintenue entre 18 et 25 °C et qu'une absorbance supérieure à 2,0 n'est pas compatible avec votre lecteur de plaque, contrôler le développement du substrat dans les puits Étalon F ; interrompre la réaction lorsque la densité optique atteint 1,2 à 1,5 puis lire la/les plaque(s).

Arrêt/Lecture

18. Ajouter 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits pour interrompre la réaction.
19. Lire la densité optique à 405 nm. S'assurer que les puits ne contiennent pas de grosses bulles et que le fond des puits est propre. Lire les plaques dans les 15 minutes suivant l'ajout de solution d'arrêt.
20. Utiliser le logiciel de quantification avec une courbe d'étalonnage à 4 paramètres correspondant à l'équation (voir ci-après) pour analyser les résultats du dosage MicroVue CICP.

$$\text{Équation : } y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$$

21. Déterminer la concentration des échantillons et des contrôles à partir de la courbe étalon.
Diluer les échantillons de plus de 80 ng/ml dans du tampon d'essai et recommencer le dosage. Les valeurs de contrôle doivent s'inscrire dans la plage indiquée dans le Certificat d'analyse fourni avec le kit.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le Certificat d'analyse inclus dans ce kit est spécifique au lot et doit être utilisé pour vérifier que les résultats obtenus par votre laboratoire sont similaires à ceux obtenus par Quidel Corporation. Les valeurs de densité optique sont fournies et doivent être utilisées comme référence uniquement. Les résultats obtenus par votre laboratoire peuvent être différents.

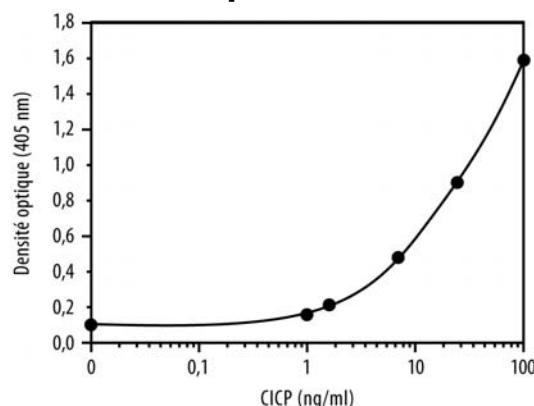
Les plages de contrôle qualité sont fournies. Les valeurs de contrôle sont destinées à vérifier la validité des résultats de la courbe et des échantillons. Chaque laboratoire devrait établir ses propres paramètres en matière de seuils d'essai acceptables. Si les valeurs de contrôle NE s'inscrivent PAS dans les limites acceptables par votre laboratoire, le dosage doit être considéré comme incertain, et les tests doivent être répétés.

Si la densité optique de l'Étalon F MicroVue CICP est inférieure à 0,8, les résultats doivent être considérés comme incertains, et les tests doivent être répétés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des échantillons doivent tenir compte de la dilution utilisée. Si l'échantillon a été dilué à 1:12, multiplier la valeur ng/ml par 12 pour obtenir le résultat final de CICP sérique en ng/ml.

Courbe étalon représentative



EXEMPLE DE VALEURS

Dans nos tests portant sur 279 adultes de plus de 25 ans, les valeurs obtenues via le kit MicroVue CICP allaient de 69 à 163 ng/ml. Dans nos tests portant sur 370 enfants de 4 à 18 ans, les valeurs de CICP obtenues allaient de 110 à 966 ng/ml, avec une moyenne de 326 ng/ml.

Les valeurs peuvent être affectées par certains facteurs comme la croissance, une faible production d'œstrogènes, un apport limité en calcium ou une activité physique réduite. Le déficit en œstrogènes chez les femmes ménopausées peut entraîner une hausse du renouvellement des cellules osseuses, et donc de la production de collagène. Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de référence.

PERFORMANCES DU TEST

Spécificité des anticorps

Les anticorps anti-CICP ont été testés par rapport au CICP provenant de fibroblastes humains en culture. Les anticorps présentent une réactivité croisée de 100 % avec le CICP présent dans le sérum humain.

Seuils de détection

Le seuil minimum de détection analytique de l'essai MicroVue CICP est de 0,2 ng/ml, déterminé par le seuil supérieur des trois écarts-types dans une étude à zéro étalon.

Précision

La précision intra-cycle et inter-cycles a été déterminée en testant trois échantillons sériques. Des résultats types sont fournis ci-dessous.

CICP (ng/ml)	Intra-cycle ¹ C.V. (%)	Inter-cycles ² C.V. (%)
80,8	6,8	7,0
98,1	5,5	7,2
296,7	6,6	5,0

¹ n = 20 répliqués

² n = 3 cycles sur 3

Récupération – Linéarité

La linéarité a été déterminée en diluant des échantillons en série et en comparant les valeurs observées avec les valeurs anticipées. Des résultats types sont fournis ci-dessous.

Echantillon	Facteur de dilution	Observé (ng/ml)	Attendu (ng/ml)	Récupération (%)
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

Récupération – Récupération maximale

La récupération maximale a été déterminée par l'ajout de quantités connues de CICIP purifié aux échantillons de sérum, à différents niveaux de CICIP endogène ; les résultats type figurent ci-après.

Echantillon	Endogène (ng/ml)	Ajouté (ng/ml)	Observé (ng/ml)	Récupération (%)
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

Pour des services en dehors des États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site www.quidel.com.

RÉFÉRENCES

- Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
- Melkko J, Niemi S, Risteli J. Radioimmunoassay of the carboxy terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin. Chem.* 1990;36:1328-1332.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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;8:5341. (abst)

GLOSSAIRE



Consulter les instructions d'utilisation au CDROM

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

 **QUIDEL**[®]
CORPORATION
SPECIALTY PRODUCTS
RESEARCH TO RAPIDS[®]

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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany