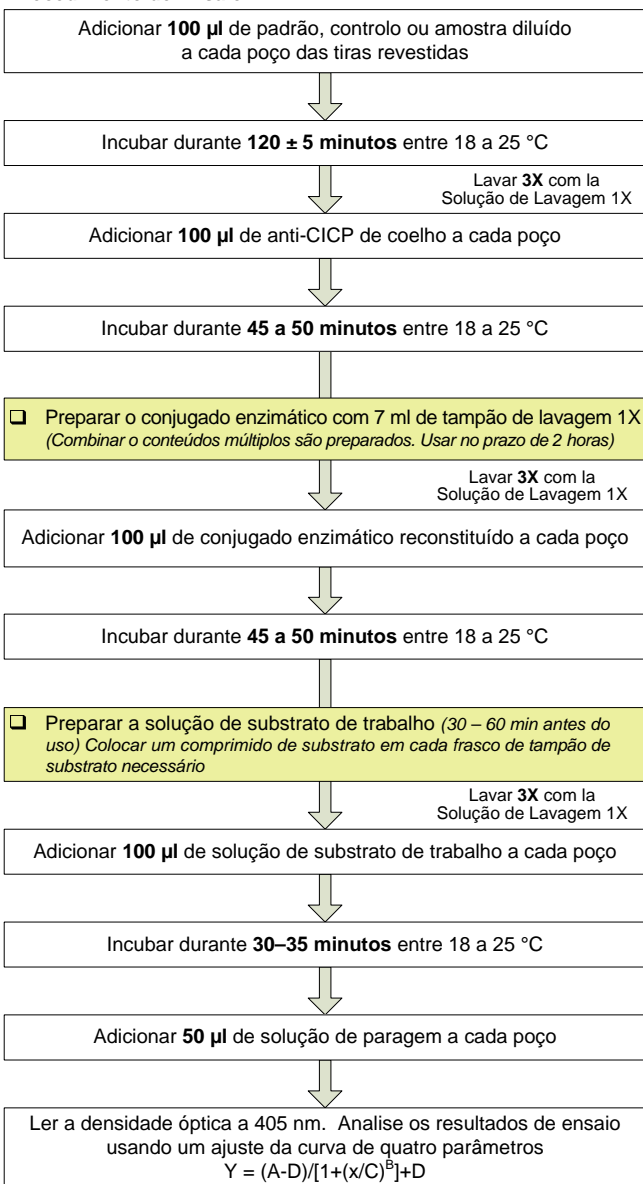


MicroVue™ CICP EIA Sumário

Preparação do Reagente e da Amostra

- Dilui o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada
- Diluir amostras de soro na proporção de 1:12 com tampão de análise (por exemplo, 25 µl de soro + 275 µl de tampão de análise)

Procedimento de Ensaio



RESUMO E EXPLICAÇÃO

O colagénio, uma molécula em hélice tripla que forma a estrutura fibrosa de todos os tecidos conjuntivos, é sintetizado como procolagénio, uma molécula precursora de maiores dimensões. O procolagénio é composto por

colagénio maduro com péptidos de extensão no amino e carboxi terminais. Estes péptidos de extensão ou propéptidos são clivados da molécula do colagénio por proteases específicas antes da incorporação do colagénio em fibras de colagénio em crescimento. A entrada destes péptidos na circulação oferece uma representação estequiométrica da produção do colagénio.

O MicroVue CICP EIA Kit oferece um método quantitativo para a determinação dos níveis de CICP (Propéptido C-terminal de Colagénio Tipo I) no soro. Os níveis de CICP são indicativos da produção de colagénio *in vivo*. Como constituinte orgânico primário do osso, os níveis de Colagénio Tipo I têm sido associados ao desenvolvimento e formação ósseos. Têm-se verificado níveis elevados de CICP em patologias associadas a níveis elevados de renovação óssea, incluindo a doença óssea de Paget, o hipertiroidismo, o hiperparatiroidismo primário e a osteodistrofia renal. Em alguns casos, foram também documentados níveis elevados de CICP na menopausa precoce. Têm-se verificado níveis baixos de CICP em crianças com uma deficiência da hormona do crescimento.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O MicroVue CICP assay é um imunoenensaio enzimático sandwich em formato de placa de microtítulos que utiliza um anticorpo anti-CICP monoclonal revestido na placa, um anti-soro anti-CICP de coelho, um conjugado com fosfatase alcalina anti-coelho de caprinos e um substrato pNPP para quantificar o CICP em soro humano.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDO

96 ensaios para o Propéptido C-terminal de Colagénio Tipo I no Soro

O MicroVue CICP EIA kit contém o seguinte:

- A** Padrões CICP: Referências 4138 – 4143 0,75 ml cada
- B** Calibradores A-F, prontos a usar, consultar concentrações no Certificado de análise
- C** Certificado de análise
- D** CICP purificada a partir de fibroblastos humanos numa solução tamponada com detergente não-iónico, estabilizador e azida de sódio (0,05 %) como conservante
- E** tamponada com detergente não-iónico, estabilizador e azida de sódio (0,05 %) como conservante
- F** sódio (0,05 %) como conservante
- L** Controlo baixo Referências 4144 0,75 ml
CICP purificada a partir de fibroblastos humanos numa solução tamponada com detergente não-iónico, estabilizador e azida de sódio (0,05 %) como conservante
- H** Controlo alto Referências 4145 0,75 ml
CICP purificada a partir de fibroblastos humanos numa solução tamponada com detergente não-iónico, estabilizador e azida de sódio (0,05 %) como conservante
- 1** Tiras revestidas Referência 4672 12 cada
Anticorpo anti-CICP monoclonal murínico absorvido em tiras de poços

- | | | | |
|---|---|------------------------|------------------|
| 2 | Solução de paragem
NaOH 0,5 N | Referência 4702 | 15 ml |
| 3 | Tampão de lavagem 10X | Referência 4703 | 55 ml |
| Detergente não-iónico numa solução tamponada com azida de sódio (0,05 %) como conservante | | | |
| 4 | Tampão de análise | Referência 4150 | 20 ml |
| Uma solução tamponada com detergente não iónico, estabilizador e azida de sódio (0,05 %) como conservante | | | |
| 5 | Tampão de substrato | Referência 4705 | 3 x 10 ml |
| Uma solução de dietanolamina e cloreto de magnésio com azida de sódio (0,05 %) como conservante | | | |
| 6 | Comprimidos de substrato | Referência 0012 | 3 x 20 mg |
| p-nitrofenil fosfato | | | |
| 7 | Conjugado enzimático | Referência 4149 | 3 frascos |
| Anticorpo IgG anti-coelho de cabra liofilizado conjugado com fosfatase alcalina com sais tampão e estabilizadores | | | |
| 8 | Anti-CICP de coelho | Referência 4148 | 14 ml |
| Anticorpo anti-CICP policlonal de coelho numa solução tamponada com detergente não-iónico, estabilizador e azida de sódio (0,05 %) como conservante | | | |

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas para aplicação de 25–300 µl
- Instrumento de laboratório adequado para a medição de 7 a 300 ml de líquido
- Tubos para diluição das amostras
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade de leitura a 405 nm
- Software adequado a uma regressão da curva de calibração de 4 parâmetros

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Apenas para fins de investigação. Não se destina à utilização em procedimentos de diagnóstico (apenas nos EUA).
2. Tratar as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.
3. Utilizar vestuário de protecção, luvas e protecção ocular/facial adequados ao manusear o conteúdo deste kit.
4. Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
5. Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
6. Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
7. O solução de paragem (NaOH 0,5 N) é considerado corrosivo e pode provocar irritação na pele. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.

8. A azida de sódio é utilizada como conservante. O contacto ou ingestão accidental de tampões com azida de sódio pode provocar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Utilizar os tampões apenas para os fins previstos e evitar o contacto com ácidos. A azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Aquando da sua eliminação, deixar correr muita água de modo a evitar uma acumulação deste produto.
9. O tampão de substrato contém dietanolamina e poderá provocar irritação nos olhos e/ou pele em caso de contacto prolongado. As zonas que tenham estado em contacto com este produto deverão ser imediatamente lavadas com água e sabão.
10. Para assegurar o fornecimento atempado dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
11. Para uma medição precisa de amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado recorrendo apenas a equipamento calibrado.
12. A colheita e conservação correctas das amostras de teste são essenciais para a obtenção de resultados precisos (ver *COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS*).
13. Evitar a contaminação microbiana ou contaminação cruzada de amostras ou reagentes.
14. Analisar cada amostra em duplicado.
15. Não usar um poço de microensaio para mais do que um teste.
16. A utilização de tempos ou temperaturas de incubação diferentes dos especificados na secção *PROCEDIMENTO DO ENSAIO* pode originar resultados erróneos.
17. Não permitir que os poços do microensaio sequem depois de iniciar o ensaio.
18. Ao remover líquido dos poços do microensaio, não raspar nem tocar no fundo dos poços.
19. As amostras hiperlipémicas, inactivadas pelo calor ou contaminadas podem produzir resultados erróneos.
20. Para evitar a formação de aerossóis durante a lavagem, utilizar um aparelho para aspirar o fluido da lavagem para um frasco com lixívia doméstica.
21. Este ensaio pode ser efectuado com qualquer método de lavagem validado.
22. Eliminar os recipientes e o conteúdo não utilizado de acordo com os regulamentos locais e nacionais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Compensar os reagentes para 18 a 25 °C antes de utilizar.

Tiras revestidas

Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro na secção *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.

Tampão de lavagem

Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro), diluindo o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 18-28 °C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nos 21 dias seguintes à preparação.

Conjugado enzimático

Preparar o conjugado enzimático 2 horas antes da sua utilização. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 7 ml de tampão de lavagem 1X. Deixar que o pellet dissolva completamente. Eliminar o conjugado enzimático restante após a utilização.

Solução de substrato de trabalho

Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário entre 18 a 25 °C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente. Eliminar a solução de substrato de trabalho restante após a utilização.

ARMAZENAMENTO

Armazenar o kit entre 2 a 8 °C.

Armazenar os reagentes entre 2 a 8 °C.

Conservar o tampão de lavagem 1X (10X diluído) entre 18 a 28 °C.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Efectuar a colheita do soro utilizando uma técnica de venipunctura padrão, sem anticoagulantes e de forma a evitar a hemólise. Deixar o sangue coagular e separar o soro por centrifugação. Armazenar o soro refrigerado (2-8 °C) para um período de armazenamento inferior a 5 dias ou congelado a ≤ -20 °C para períodos mais longos. Não sujeitar as amostras a mais de 3 ciclos de congelação e descongelação.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Ler o folheto informativo completo antes de iniciar o ensaio

Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* antes de prosseguir.

Determinar a quantidade necessária de cada reagente para o número de tiras que vão ser utilizadas.

N.º de tiras	4	6	8	12
N.º de amostras (analisadas em duplicado)	8	16	24	40
Conjugado enzimático (frasco)	1	1	2*	2*
Tampão de substrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampão de lavagem 1X (ml)	100	150	200	300

* Se se for utilizar mais do que um frasco, combinar o conteúdo e misturar antes de utilizar.

Diluição/incubação da amostra

1. Diluir amostras de soro na proporção de 1:12 com tampão de análise (por exemplo, 25 µl de soro + 275 µl de tampão de análise).

2. Permitir a compensação da bolsa de tiras revestidas entre 18 a 25 °C antes de a abrir. Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada e contém dessecante.
3. Colocar o número pretendido de tiras revestidas na armação das tiras de poços antes de utilizar. Rotular as tiras para evitar que se misturem em caso de remoção acidental da armação das tiras de poços.
4. Adicionar 100 µl de padrão, controlo ou amostra diluídos a cada poço das tiras revestidas. Este passo deverá estar concluído em 30 minutos.
5. Incubar durante 120 ± 5 minutos entre 18 a 25 °C.

Fase de lavagem (1)

6. Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro) diluindo o tampão de lavagem 10X concentrado na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 18-28 °C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nos 21 dias seguintes à preparação.
7. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 300 µl de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as bem sobre toalhas de papel após a última lavagem.

Incubação de anticorpos

8. Adicionar 100 µl de anti-CICP de coelho a cada poço.
9. Incubar durante 45 a 50 minutos entre 18 a 25 °C.
10. Durante a incubação, preparar o conjugado enzimático. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 7 ml de tampão de lavagem 1X. Misturar bem. Usar no prazo de 2 horas.

Fase de lavagem (2)

11. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 300 µl de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as bem sobre toalhas de papel após a última lavagem.

Incubação do conjugado enzimático

12. Adicionar 100 µl de conjugado enzimático reconstituído a cada poço.
13. Incubar durante 45 a 50 minutos entre 18 a 25 °C.
14. Durante a incubação, preparar a solução de substrato de trabalho. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário entre 18 a 25 °C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente. Usar no prazo de 1 hora.

Fase de lavagem (3)

15. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 300 µl de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as bem sobre toalhas de papel após a última lavagem.

Incubação do substrato

- Adicionar 100 µl de solução de substrato de trabalho a cada poço.
- Incubar durante 30–35 minutos entre 18 a 25 °C. Se não for possível manter a temperatura ambiente entre 18 e 25 °C e se uma absorvência > 2,0 não for compatível com o leitor de placas, monitorizar o desenvolvimento do substrato nos poços de Padrão F; parar a reacção quando a densidade óptica atingir 1,2 a 1,5; de seguida, proceder à leitura das tiras.

Parar/Ler

- Adicionar 50 µl de solução de paragem a cada poço para parar a reacção.
- Ler a densidade óptica a 405 nm. Assegurar que não existem bolhas de grandes dimensões nos poços e que o fundo das tiras está limpo. Ler as tiras 15 minutos depois da adição da solução de paragem.
- Utilizar software de quantificação com uma equação de regressão adequada a uma curva de calibração de 4 parâmetros (ver abaixo) para analisar os resultados do ensaio MicroVue CICP.
Equação: $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$
- Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão.
Diluir as amostras superiores a 80 ng/ml em tampão de análise e analisar novamente. Os valores de controlo devem estar dentro dos limites especificados no Certificado de Análise fornecido com o kit.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos pelo seu laboratório são semelhantes aos obtidos na Quidel Corporation. Os valores da densidade óptica são fornecidos e devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

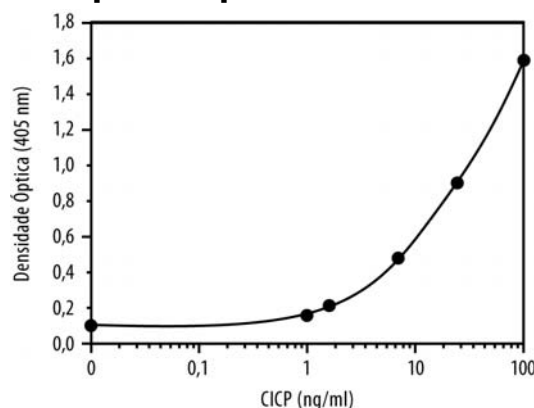
São fornecidos intervalos para o controlo de qualidade. Os valores de controlo destinam-se a verificar a validade da curva e os resultados das amostras. Cada laboratório deve definir os seus próprios parâmetros para os limites aceitáveis dos ensaios. Se os valores de controlo NÃO estiverem dentro dos limites de aceitação do laboratório, os resultados dos ensaios devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

Se a densidade óptica do MicroVue CICP Standard F for inferior a 0,8, os resultados devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados das amostras devem ser corrigidos para a diluição feita. Se a amostra foi diluída numa proporção de 1:12, multiplicar o valor em ng/ml por 12 para obter um resultado final do CICP de soro em ng/ml.

Curva padrão representativa



VALORES EXEMPLIFICATIVOS

Em testes realizados a 279 adultos com mais de 25 anos de idade, os valores obtidos com o MicroVue CICP kit variavam entre 69 a 163 ng/ml. Em testes realizados a 370 crianças entre 4 e 18 anos de idade, os valores CICP obtidos variavam entre 110 ao 966 ng/ml, com uma média de CICP a 326 ng/ml.

Os valores podem ser influenciados por factores como a baixa produção de estrogénio, baixa ingestão de cálcio, actividade física reduzida. A deficiência de estrogénio nas mulheres após a menopausa pode ter como resultado uma renovação óssea aumentada e, por consequência, na produção de colagénio. Cada laboratório deve definir os seus próprios limites de referência.

DESEMPENHO DO TESTE

Especificidade dos anticorpos

Os anticorpos anti-CICP foram aumentados contra o CICP derivado de fibroblastos humanos em cultura. Os anticorpos revelam uma reactividade cruzada a 100 % com o CICP em soro humano.

Limites de detecção

O limite de detecção analítica mínimo do MicroVue CICP Assay é de 0,2 ng/ml, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de padrão zero.

Precisão

A precisão intra e entre ensaios foi determinada através da análise a três amostras de soro. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

CICP (ng/ml)	Intra ensaios ¹ C.V.(%)	Entre ensaios ² C.V.(%)
80,8	6,8	7,0
98,1	5,5	7,2
296,7	6,6	5,0

¹ n = 20 réplicas

² n = 3 em 3 ensaios

Recuperação – Linearidade

A linearidade foi determinada diluindo amostras em série e comparando os valores observados com os valores esperados. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Factor de diluição	Observado (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	Recuperação (%)
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

Recuperação – Recuperação por fortificação

A recuperação por fortificação foi determinada adicionando uma quantidade conhecida de CICIP purificada a amostras de soro com diferentes níveis de CICIP endógena. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Endógena (ng/ml)	Adicionada (ng/ml)	Observada (ng/ml)	Recuperação (%)
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

ASSISTÊNCIA

Para serviços fora dos EUA, contactar o distribuidor local. A informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em www.quidel.com.

REFERÊNCIAS

- 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)

GLOSSÁRIO



Consulte as instruções de utilização no 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