

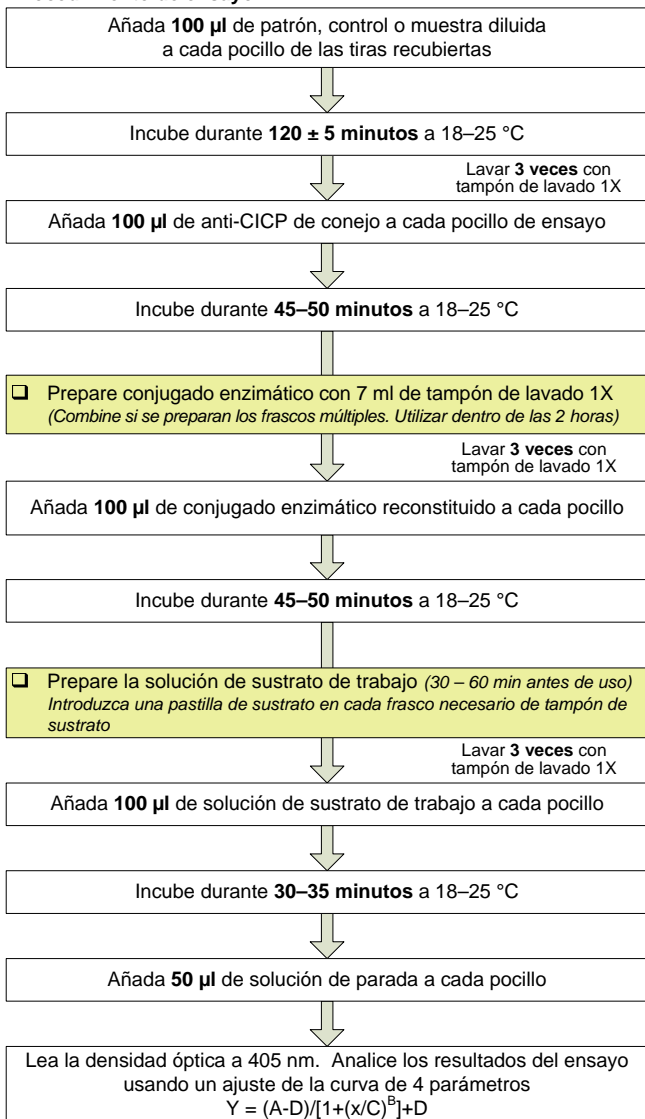
Enzimoimmunoensayo para la medición cuantitativa del propéptido C-terminal del colágeno tipo I (CICP) en suero

El Resumen de EIA MicroVue™ CICP

Preparación del Reactivo y de la Muestra

- Diluir el tampón de lavado 10X en una proporción de 1:10 con agua desionizada
- Diluya las muestras de suero en una proporción de 1:12 con tampón de ensayo (por ejemplo, 25 µl de suero + 275 µl de tampón de ensayo)

Procedimiento de ensayo



RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El colágeno, la molécula de triple hélice que forma la estructura fibrosa de todos los tejidos conectivos, se sintetiza como procolágeno, una molécula precursora más grande. El procolágeno consta de colágeno maduro con péptidos de extensión en los terminales amino y carboxi. Estos péptidos de extensión, o propéptidos, son separados de la molécula de colágeno por proteasas

específicas antes de incorporar el colágeno a una fibrilla de colágeno en crecimiento. La liberación de estos péptidos en la circulación proporciona una representación estequiométrica de la producción de colágeno.

El kit MicroVue CICP EIA proporciona un método cuantitativo para determinar los niveles de CICP (C-terminal del colágeno tipo I) en suero. Los niveles de CICP son indicativos de la producción de colágeno *in vivo*. Como principal constituyente orgánico del hueso, los niveles de colágeno tipo I se han vinculado con el crecimiento y la formación de los huesos. Se han detectado niveles elevados de CICP en enfermedades asociadas con altos niveles de renovación de las células óseas, entre ellas enfermedad de Paget de los huesos, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo primario y osteodistrofia renal. En algunos casos, también se han documentado niveles elevados de CICP en la menopausia prematura. Se han detectado bajos niveles de CICP en niños con deficiencia de hormonas del crecimiento.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo MicroVue CICP es un enzimoimmunoensayo tipo sándwich en placa de microtitulación que utiliza un anticuerpo anti-CICP monoclonal recubierto sobre la placa, un antisuero anti-CICP de conejo, un conjugado de fosfatasa alcalina anti-conejo de cabra y un sustrato pNPP para la cuantificación del CICP en el suero humano.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

96 ensayos para el propéptido C-terminal del colágeno tipo I en suero

El kit MicroVue CICP EIA contiene lo siguiente:

- A Patrones CICP:** Cód. 4138 – 4143 0,75 ml de cada uno
- B Calibradores A-F, listos para su uso, concentraciones en el**
- C Certificado de análisis**
- D** CICP purificado de células de fibroblasto humanas en una solución tamponada con detergente no iónico, estabilizador y azida sódica (0,05 %) como conservante
- E**
- F**
- L Control bajo** Cód. 4144 0,75 ml
CICP purificado de células de fibroblasto humanas en una solución tamponada con detergente no iónico, estabilizador y azida sódica (0,05 %) como conservante
- H Control alto** Cód. 4145 0,75 ml
CICP purificado de células de fibroblasto humanas en una solución tamponada con detergente no iónico, estabilizador y azida sódica (0,05 %) como conservante
- 1 Tiras recubiertas** Cód. 4672 12 unidades
Anticuerpo anti-CICP monoclonal murino purificado adsorbido sobre tiras de pocillos
- 2 Solución de parada** Cód. 4702 15 ml
NaOH 0,5 N

- 3 Tampón de lavado 10X** Cód. 4703 55 ml
Detergente no iónico en una solución tamponada con azida sódica (0,05 %) como conservante
- 4 Tampón de ensayo** Cód. 4150 20 ml
Solución tamponada con detergente no iónico, estabilizador y azida sódica (0,05 %) como conservante
- 5 Tampón de sustrato** Cód. 4705 3 x 10 ml
Una solución de dietanolamina y cloruro de magnesio con azida sódica (0,05 %) como conservante
- 6 Pastillas de sustrato** Cód. 0012 3 x 20 mg
Fosfato de p-nitrofenil
- 7 Conjugado enzimático** Cód. 4149 3 viales
Anticuerpo IgG anti-conejo de cabra liofilizado conjugado con fosfatasa alcalina con sales amortiguadoras y estabilizadores
- 8 Anti-CICP de conejo** Cód. 4148 14 ml
Anticuerpo anti-CICP policlonal de conejo en una solución tamponada con detergente no iónico, estabilizador y azida sódica (0,05 %) como conservante

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Micropipetas de 25–300 µl
- Material de laboratorio adecuado para medir 7–300 ml de líquidos
- Tubos para la dilución de muestras
- Recipiente para dilución del tampón de lavado
- Agua desionizada o destilada
- Lector de placas capaz de leer a 405 nm
- Software de ajuste de curva de calibrado de 4 parámetros

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso investigativo únicamente en los EE.UU. No utilizar para procedimientos diagnósticos (sólo en los EE.UU.).
2. Trate las muestras como material potencialmente biopeligroso. Respete las precauciones universales al manipular el contenido de este kit y las muestras de los pacientes.
3. Use ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular/ facial al manipular el contenido de este kit.
4. Use los reactivos suministrados como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
5. Guarde los reactivos de ensayo según lo indicado.
6. No emplee las tiras recubiertas si la bolsa está pinchada.
7. El Solución de parada (NaOH 0,5 N) se considera corrosivo y puede provocar irritación en la piel. No lo ingiera. Evite el contacto con la piel, los ojos y la ropa. En caso de contacto, lave con agua. En caso de ingestión, solicite asistencia médica.
8. La azida sódica se utiliza como conservante. El contacto o la ingestión accidentales de tampones que contienen azida sódica pueden provocar irritación en la piel, los ojos o la boca. Emplee los tampones únicamente para los fines previstos y evite el contacto con ácidos. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Después de desecharla, enjuague con agua abundante para evitar la acumulación de azida.

9. El tampón de sustrato contiene dietanolamina y puede causar irritación en los ojos y en la piel con el contacto prolongado. Las áreas que entren en contacto con el tampón deben lavarse de inmediato con agua y jabón.
10. Se recomienda utilizar pipetas multicanal o pipeteros de repetición para garantizar la administración de los reactivos en el momento adecuado.
11. Para una medición exacta de las muestras, añada las muestras y los patrones con precisión. Pipetee cuidadosamente utilizando sólo equipo calibrado.
12. Es fundamental recoger y almacenar de forma adecuada las muestras de ensayo para obtener resultados precisos (vea la sección *RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS*).
13. Evite la contaminación microbiana o cruzada de las muestras o reactivos.
14. Analice cada muestra por duplicado.
15. No utilice un pocillo de microensayo para más de un ensayo.
16. El uso de tiempos y temperaturas de incubación que no sean los indicados en la sección Procedimiento de ensayo puede dar resultados erróneos.
17. No permita que los pocillos de microensayo se sequen una vez iniciado el ensayo.
18. Al eliminar líquidos de los pocillos de microensayo, no raspe ni toque el fondo de los pocillos.
19. Las muestras inactivadas por calor, hiperlipémicas o contaminadas pueden dar resultados erróneos.
20. Para evitar la formación de aerosoles durante el lavado, utilice un aparato para aspirar el líquido de lavado al interior de un frasco que contenga lejía de uso doméstico.
21. Este ensayo puede realizarse con cualquier método de lavado homologado.
22. Deseche los recipientes y el contenido no utilizado de acuerdo con la normativa internacional, nacional y local.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Deje que los reactivos se estabilicen a 18–25 °C antes de utilizarlos.

Tiras recubiertas

Retire la estructura de tiras de pocillos y el número necesario de tiras recubiertas de la bolsa (vea la sección *PROCEDIMIENTO DE ENSAYO*). Asegúrese de que la bolsa que contiene las tiras no utilizadas queda perfectamente sellada.

Tampón de lavado

Prepare la cantidad necesaria de tampón de lavado 1X (vea la tabla) diluyendo tampón de lavado 10X con agua desionizada en una proporción de 1:10. Conservar a 18–28 °C. Utilice el tampón de lavado 1X dentro de los 21 días de su preparación.

Conjugado enzimático

Prepare el conjugado enzimático dentro de las 2 horas previas a su uso. Reconstituya cada vial necesario de conjugado enzimático (vea la tabla) con 7 ml de tampón de lavado 1X. Deje que la pelotilla se disuelva completamente. Deseche el conjugado enzimático restante tras su uso.

Solución de sustrato de trabajo

Prepare la solución de sustrato de trabajo 1 hora antes de su uso como máximo. Introduzca una pastilla de sustrato en cada frasco necesario de tampón de sustrato a 18-25 °C (vea la tabla). Deje disolver las pastillas durante 30-60 minutos. Agite vigorosamente los frascos para mezclar completamente. Deseche la solución de sustrato de trabajo restante tras su uso.

CONSERVACIÓN

Conserve el kit y los reactivos no utilizados a 2-8 °C. Conserve el tampón de lavado 1X (diluido 10X) a 18-28 °C.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoja las muestras de suero utilizando una técnica de venipunción convencional, sin anticoagulantes y evitando la hemólisis. Deje que la sangre coagule y separe el suero mediante centrifugado. Conserve el suero refrigerado a 2-8 °C para usarlo dentro de los 5 días o congélelo a una temperatura ≤ -20 °C para un período de conservación más prolongado. No someta las muestras a más de 3 ciclos de congelación/descongelación.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Lea el prospecto del producto en su totalidad antes de iniciar el ensayo.

Vea la sección *PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS* antes de continuar.

Determine la cantidad necesaria de cada reactivo para el número de tiras que desea utilizar.

Nº de tiras	4	6	8	12
Nº de muestras (analizadas por duplicado)	8	16	24	40
Conjugado enzimático (vial)	1	1	2*	2*
Tampón de sustrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampón de lavado 1X (ml)	100	150	200	300

* Cuando se vaya a utilizar más de un frasco o vial, combine el contenido y mezcle antes de usarlo.

Dilución e incubación de las muestras

- Diluya las muestras de suero en una proporción de 1:12 con tampón de ensayo (por ejemplo, 25 μ l de suero + 275 μ l de tampón de ensayo).
- Deje que la bolsa de tiras recubiertas se estabilice a una temperatura de 18-25 °C antes de abrirla. Retire la estructura de tiras de pocillos y el número necesario de tiras recubiertas de la bolsa (vea la tabla). Asegúrese de que la bolsa que contiene las tiras no utilizadas queda perfectamente sellada y contiene desecante.
- Introduzca el número deseado de tiras recubiertas en la estructura de tiras de pocillos justo antes de utilizarlas. Etiquete las tiras para evitar confusiones en caso de retirarlas accidentalmente de la estructura.
- Añada 100 μ l diluidos de patrón, control o muestra a cada pocillo de las tiras recubiertas. Este paso debe completarse en 30 minutos.
- Incube durante 120 \pm 5 minutos a 18-25 °C.

Lavado-Paso 1

- Prepare la cantidad necesaria de tampón de lavado 1X (vea la tabla) diluyendo tampón de lavado 10X con agua desionizada en una proporción de 1:10. Conserve a 18-28 °C. Utilice el tampón de lavado 1X dentro de los 21 días de su preparación.
- Invierta/vacíe manualmente las tiras. Añada como mínimo 300 μ l de tampón de lavado 1X a cada pocillo e invierta/vacíe manualmente las tiras. Repita dos veces más hasta un total de tres lavados. Seque vigorosamente las tiras sobre toallitas de papel después del último lavado.

Incubación de anticuerpos

- Añada 100 μ l de anti-CICP de conejo a cada pocillo de ensayo.
- Incube durante 45-50 minutos a 18-25 °C.
- Mientras se incuba, prepare conjugado enzimático. Reconstituya cada vial necesario de conjugado enzimático (vea la tabla) con 7 ml de tampón de lavado 1X. Mezcle bien. Utilizar dentro de las 2 horas.

Lavado-Paso 2

- Invierta/vacíe manualmente las tiras. Añada como mínimo 300 μ l de tampón de lavado 1X a cada pocillo e invierta/vacíe manualmente las tiras. Repita dos veces más hasta un total de tres lavados. Seque vigorosamente las tiras sobre toallitas de papel después del último lavado.

Incubación del conjugado enzimático

- Añada 100 μ l de conjugado enzimático reconstituido a cada pocillo.
- Incube durante 45-50 minutos a 18-25 °C.
- Mientras se incuba, prepare la solución de sustrato de trabajo. Introduzca una pastilla de sustrato en cada frasco necesario de tampón de sustrato a 18-25 °C (vea la tabla). Deje disolver las pastillas durante 30-60 minutos. Agite vigorosamente los frascos para mezclar completamente. Utilizar dentro de 1 hora de su preparación.

Lavado-Paso 3

- Invierta/vacíe manualmente las tiras. Añada como mínimo 300 μ l de tampón de lavado 1X a cada pocillo e invierta/vacíe manualmente las tiras. Repita dos veces más hasta un total de tres lavados. Seque vigorosamente las tiras sobre toallitas de papel después del último lavado.

Incubación del sustrato

- Añada 100 μ l de solución de sustrato de trabajo a cada pocillo.
- Incube durante 30-35 minutos a 18-25 °C. Si no pudiera mantenerse la temperatura ambiente entre 18-25 °C y no fuera compatible una absorbancia $> 2,0$ con el lector de placas, controle el desarrollo del sustrato en los pocillos de patrón F; detenga la reacción cuando la densidad óptica alcance 1,2-1,5 y, a continuación, lea las tiras.

Parada/lectura

- Añada 50 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción.
- Lea la densidad óptica a 405 nm. Asegúrese de que no hay burbujas grandes en los pocillos y que el fondo de las tiras está limpio. Las tiras deben leerse dentro de los **15 minutos** de incorporada la solución de parada.
- Utilice software de cuantificación con una ecuación de ajuste de curva de calibrado de 4 parámetros para analizar los resultados del ensayo MicroVue CICIP.
Ecuación: $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$
- Determine la concentración de las muestras y los controles a partir de la curva estándar.
Diluya las muestras de más de 80 ng/ml en tampón de ensayo y repita el análisis. Los valores de control deberán estar dentro del intervalo especificado en el certificado de análisis suministrado con el kit.

CONTROL DE CALIDAD

El certificado de análisis incluido en este kit es específico a este lote y debe emplearse para comprobar que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los obtenidos por Quidel Corporation. Se proporcionan los valores de densidad óptica, pero deberán utilizarse únicamente a efectos orientativos. Los resultados obtenidos por su laboratorio pueden ser diferentes.

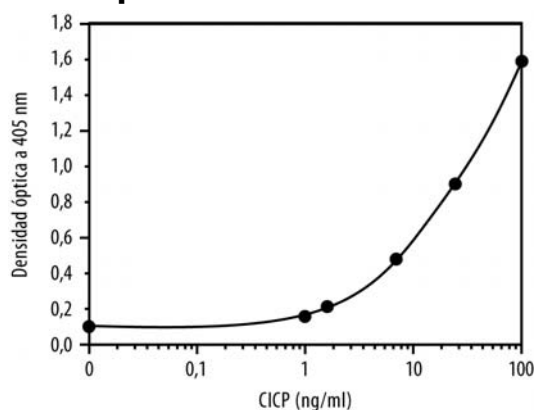
Se proporcionan los intervalos de control de calidad. Los valores de control están diseñados para comprobar la validez de la curva y los resultados de las muestras. Cada laboratorio debe establecer sus propios parámetros para determinar los límites de análisis aceptables. Si los valores de control NO están dentro de los límites de aceptación de su laboratorio, los resultados del análisis deben considerarse dudosos y deberán volver a analizarse las muestras.

Si la densidad óptica del patrón F MicroVue CICIP es inferior a 0,8, los resultados deberán considerarse dudosos y deberán volver a analizarse las muestras.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben corregirse según la dilución realizada. Si la muestra se diluyó en una proporción de 1:12, multiplique el valor ng/ml por 12 para obtener el resultado final de CICIP sérico en ng/ml.

Curva representativa estándar



VALORES ESPERADOS

En las pruebas realizadas en 279 adultos de más de 25 años de edad, los valores obtenidos con el kit MicroVue CICIP fueron de 69 a 163 ng/ml. En las pruebas realizadas en 370 niños de 4-18 años de edad, los valores de CICIP obtenidos fueron de 110 a 966 ng/ml, con una media de 326 CICIP ng/ml.

Los valores pueden estar influidos por factores como crecimiento, baja producción de estrógenos, baja ingesta de calcio o poca actividad física. La deficiencia de estrógenos en mujeres posmenopáusicas puede provocar una mayor renovación de las células óseas y, en consecuencia, mayor producción de colágeno. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia.

RENDIMIENTO DE LA PRUEBA

Especificidad de los anticuerpos

Se elevaron los anticuerpos anti-CICIP en relación con los CICIP derivados de células de fibroblasto humanas en cultivo. Los anticuerpos demuestran una reactividad cruzada del 100 % con el CICIP en suero humano.

Límites de detección

El límite de detección analítica mínimo del ensayo MicroVue CICIP es de 0,2 ng/ml, determinado por el límite superior de DE 3 en un estudio de patrón cero.

Precisión

Se determinaron las precisiones intra-análisis e inter-análisis analizando tres muestras de suero. A continuación se muestran los resultados típicos.

CICIP (ng/ml)	Intra-análisis ¹ CV %	Inter-análisis ² CV %
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 en 3 análisis

Recuperación Linealidad

La linealidad se determinó diluyendo en serie las muestras y comparando los valores observados con los valores esperados. A continuación se muestran los resultados típicos.

Muestra	Factor de dilución	Observado (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	Recuperación (%)
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

Recuperación Recuperación de la concentración máxima

La recuperación de la concentración máxima se determinó añadiendo cantidades conocidas de CICP purificado a muestras de suero con diferentes niveles de CICP endógeno. A continuación se muestran los resultados típicos.

Muestra	Endógeno (ng/ml)	Añadido (ng/ml)	Observado (ng/ml)	Recuperación (%)
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

ASISTENCIA

Para servicios fuera de los EE.UU., póngase en contacto con su distribuidor local. Información adicional de Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores puede encontrarse en nuestra página web www.quidel.com.

REFERENCIAS

- 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, Garnero P, Seyedin S. A serum immunoassay for the C-terminal propeptide of type I collagen. *J. Bone. Miner. Res.* 1993;8:5341. (abst)

GLOSARIO



Consulte las instrucciones de uso en CDROM

REF 8003 – **MICROVUE** CICP 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