

En enzymimmunoanalys för kvantitativ mätning av C-terminalpropeptid av typ I-kollagen (CICP) i serum

### MicroVue™ CICP EIA Summariskt

#### Reagent och Prov Förberedelse

- Späd 10x tvättbuffert 1:10 med avjoniserat vatten
- Späd serumprover i förhållandet 1:12 med analysbuffert (exempelvis 25 µl serum + 275 µl analysbuffert)

#### Analysförfarande

Tillsätt **100 µl** standard, kontroll eller utspädd serumprov i varje brunn på remsorna med beläggning

Inkubera i **120 ± 5 minuter** vid en temperatur på 18–25 °C

Tvätta **3 gånger**  
med 1X tvättbuffert

Tillsätt **100 µl** kanin-anti-CICP till varje brunn

Inkubera i **45–50 minuter** vid en temperatur på 18–25 °C

- Bered enzymkonjugatet med 7 ml 1X-tvättbuffert (Blanda omsorgsfullt. Använd inom 2 timmar)

Tvätta **3 gånger**  
med 1X tvättbuffert

Tillsätt **100 µl** rekonstituerat enzymkonjugat i varje brunn

Inkubera i **45–50 minuter** vid en temperatur på 18–25 °C

- Bered arbetssubstratlösningen (30 – 60 min före användning) Lägg en substrattablett i varje flaska substratbuffert

Tvätta **3 gånger**  
med 1X tvättbuffert

Tillsätt **100 µl** arbetssubstratlösning i varje brunn

Inkubera i **30–35 minuter** vid en temperatur på 18–25 °C

Tillsätt **50 µl** stopplösning till varje brunn

Avläs den optiska densiteten vid 405 nm. En kurvpasningsekvation med 4-parameterkalibrering, måste användas för att analysera testresultat  
 $Y = (A-D)/[1+(x/C)^B]+D$

### SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Kollagen, den trippelhelixmolekyl som bildar den fibrösa ramen för all bindväv, syntetiseras som prokollagen, en större stammolekyl. Prokollagen består av moget kollagen med utökningspeptider i såväl amino- som karboxyändan. Dessa utökningspeptider, eller proteptider, klyvs från kollagenmolekylen av specifika proteaser före intagandet av kollagenet i en växande kollagenfibril. Frigörandet av

dessa peptider till kretsloppet sörjer för en stoikiometrisk återgivning av kollagenproduktionen.

MicroVue CICP EIA Kit tillhandahåller en kvantitativ metod för bestämning av CICP (C-terminalt av typ I kollagen) i serum. CICP-halter indikerar kollagenproduktion *in vivo*. Typ I kollagen-halter har, som den primära, organiska beståndsdelen i ben, kopplats till bentillväxt och formation. Förhöjda halter av CICP har påvisats i sjukdomar som associeras med höga halter av benomsättning, inklusive Pagets bensjukdom, hypertyroidism, primär hyperparatyroidism och renal osteodystrofi. I vissa fall har förhöjda halter av CICP även dokumenterats vid tidig menopaus. Låga halter av CICP har påvisats hos barn med brist på tillväxthormon.

### PROCEDURENS PRINCIP

MicroVue CICP-analysen utgör en sandwichenzym-immunoanalys i mikrotitrerplattformatet, som använder en monoklonal anti-CICP-antikropp som belagts på plattan, ett kanin-anti-CICP-antiserum, ett get-anti-kanin-alkalifosfataskonjugat, samt ett pNPP-substrat för kvantifiering av CICP i humant serum.

### MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH MATERIAL

#### 96 analyser för C-terminalpropeptid av typ I-kollagen i serum

MicroVue CICP EIA-satsen innehåller följande:

**A** CICP-standarder: Komponent 4138–4143 0,75 ml vardera  
**B** Standard A-F, bruksfärdiga, koncentration se Analyscertifikat  
**C** CICP som renats från humana fibroblastceller i en buffrad lösning  
**D** som innehåller icke-joniskt rengöringsmedel, stabiliserare och  
**E** natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel  
**F**

**L** Låga kontroll Komponent 4144 0,75 ml  
 CICP som renats från humana fibroblastceller i en buffrad lösning som innehåller icke-joniskt rengöringsmedel, stabiliserare och natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel

**H** Höga kontroll Komponent 4145 0,75 ml  
 CICP som renats från humana fibroblastceller i en buffrad lösning som innehåller icke-joniskt rengöringsmedel, stabiliserare och natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel

**1** Remsor med beläggning Art. 4672 12 var  
 Renad mus-monoklonal anti-CICP-antikropp på Stripwell-remsor

**2** Stopplösning Art. 4702 15 ml  
 0,5 N NaOH

**3** 10x tvättbuffert Art. 4703 55 ml  
 Nonjonaktivt rengöringsmedel i buffertlösning med natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel

**4** Analysbuffert Art. 4150 20 ml  
 En buffrad lösning som innehåller nonjonaktivt rengöringsmedel, stabilisator och natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel

- |          |  |                  |                  |
|----------|--|------------------|------------------|
| <b>5</b> | <b>Substratbuffert</b>   | <b>Art. 4705</b> | <b>3 x 10 ml</b> |
|          | Lösning av dietanolamin och magnesiumklorid med natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel  |                  |                  |
| <b>6</b> | <b>Substrattabletter</b>   | <b>Art. 0012</b> | <b>3 x 20 mg</b> |
|          | p-nitrofenylfosfat   |                  |                  |
| <b>7</b> | <b>Enzymkonjugat</b>   | <b>Art. 4149</b> | <b>3 flaskor</b> |
|          | Lyofiliserad get-anti-kanin-IgG-antikropp konjugerat till alkalisk fosfatase innehållande buffertsalter och stabilisatorer   |                  |                  |
| <b>8</b> | <b>Kanin-anti-CICP</b>   | <b>Art. 4148</b> | <b>14 ml</b>     |
|          | Kanin-polyklonal-anti-CICP-antikropp i en buffrad lösning som innehåller icke-joniskt rengöringsmedel, stabiliserare och natriumazid (0,05 %) som konserveringsmedel |                  |                  |

#### MATERIAL SOM BEHÖVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

- Mikropipetter för 25 till 300 µl
- Laboratorieutrustning för vätskemätning av volymer på 7–300 ml
- Rör för provspädning
- Behållare för tvättbuffertlösning
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Plattläsare för avläsning vid 405 nm
- Programvara för kurvpassning med 4-parameterskalibrering

#### VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSANVISNINGAR

1. Endast för forskningsbruk i USA. Inte för användning i diagnostikförfaranden (endast USA).
2. Behandla alla prover som biologiskt riskmaterial. Hantera satsens innehåll och patientprover med försiktighet.
3. Bär lämpliga skyddskläder, handskar och ögon/ansiktsskydd ved håndtering af dette kit.
4. Medföljande reagenser används som en enhet fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen.
5. Förvara analysreagenser enligt anvisningen.
6. Använd inte remsor med beläggning om det finns hål på förpackningen.
7. Stopplösningen (0,5 N NaOH) är frätande och kan orsaka irritation af hud. Får inte förtäras. Undvik kontakt med hud, ögon eller kläder. Vid kontakt med lösningen måste det utsatta området omedelbart sköljas med vatten. Kontakta läkare vid förtäring.
8. Natriumazid används som konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertlösningar med natriumazid kan orsaka irritation på hud, ögon och i munnen. Använd bara buffertlösningarna för de avsedda ändamålen och undvik kontakt med syror. Natriumazid kan reagera med bly- och kopparrör och bilda högexplosiva metallazider. Spola med stora mängder vatten när azider kasseras för att undvika azidansamling.
9. Substratbufferten innehåller dietanolamin och kan irritera ögon och/eller hud vid längre kontakt. Kontaktade områden skall omedelbart tvättas med tvål och vatten.
10. Användning av multikanal- eller repeterpipetter rekommenderas vid uppmätning av reagenser.
11. För korrekt provmätning ska exakta mängder prover och standarder tillsättas. Pipettera omsorgsfullt med kalibrerad utrustning.

12. Korrekt provtagning och förvaring av testprover är av avgörande betydelse för korrekta resultat (se *PROVTAGNING OCH PROV FÖRVARING*).
13. Undvik mikrobiell kontaminering eller korskontaminering av prover eller reagenser.
14. Dubbeltesta varje prov.
15. Använd inte en mikroanalysbrunn för mer än ett test.
16. Tillämpning av andra inkubationstider och temperaturer än dem som anges i avsnittet Förfarande kan leda till felaktiga resultat.
17. Låt inte mikroanalysbrunnarna torka när analysen har påbörjats.
18. Undvik att skrapa eller beröra brunnarnas botten vid uttagning av vätskor ur mikroanalysbrunnarna.
19. Värmeinaktiverade, hyperlipemiska eller kontaminerade prover kan leda till felaktiga resultat.
20. Undvik aerosolbildning vid tvätt genom att använda en apparat som aspirerar tvättvätskan till en flaska innehållande ett kommersiellt blekmedel.
21. Analysen utförs med någon validerad tvättmetod.
22. Behållare och oanvänt innehåll ska kasseras i enlighet med gällande lagar och bestämmelser.

#### FÖRBEREDANDE AV REAGENS

**Temperaturutjämnade reagenserna vid en temperatur på 18–25 °C innan de används.**

#### Remsor med beläggning

Ta ut Stripwellramen och det antal remsor med beläggning som behövs från förpackningen (se tabellen i avsnittet *ANALYSPROCEDUR*). Förpackningar med oanvända remsor måste återförslutas helt.

#### Tvättbuffert

Bered erfordrad mängd 1x tvättbuffert (se tabell) genom att späda 10x tvättbuffert 1:10 med avjoniserat vatten. Förvara vid 18–28 °C. Använd 1x tvättbufferten inom 21 dagar från beredningen.

#### Enzymkonjugat

Bered enzymkonjugat högst två timmar innan det ska användas. Rekonstituera alla flaskor med enzymkonjugat (se tabellen) med 7 ml 1X-tvättbuffert. Låt pillret lösas upp helt och hållet. Kassera återstående enzymkonjugat efter användningen.

#### Arbetssubstratlösning

Bered arbetssubstratlösningen högst en timme innan den ska användas. Lägg en substrattablett i varje flaska substratbuffert vid 18–25 °C (se tabellen). Låt tablettens lösas upp i 30 till 60 minuter. Skaka flaskan/flaskorna kraftigt så att lösningen blandas helt. Kassera överbliven arbetssubstratlösning efter användning.

#### FÖRVARING

Förvara satsen vid 2–8 °C.

Förvara oanvänd reagens vid 2–8 °C.

Förvara 1x tvättbuffert (10x utspädd) vid 18–28 °C.

## PROVTAGNING OCH PROVBEREDNING

Ta serumproven med ett standardförfarande för venipunktur, utan anti-koagulanter, och på ett sådant sätt så att hemolys undviks. Låt blodet levra sig och avskilj serumet med centrifugering. Förvara serum antingen kylt (2–8 °C), vid förvaring i mindre än 5 dagar, eller fryst vid en temperatur på ≤ -20 °C, för längre tids förvaring. Prover får inte frysas och tinas mer än tre gånger.

## ANALYSPROCEDUR

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Läs *REAGENSBEREDNING* innan du fortsätter.

**Avgör hur mycket av varje reagens som behövs utifrån antalet remsor som ska användas.**

Antal remsor	4	6	8	12
Antal prover (parprover)	8	16	24	40
Enzymkonjugat (flaska)	1	1	2*	2*
Substratbuffert (flaska)	1	1	2*	2*
1X tvättbuffert (ml)	100	150	200	300

\* Blanda innehållet före användning om mer än en flaska används.

## Provspädning/inkubering

- Späd serumprover i förhållandet 1:12 med analysbuffert (exempelvis 25 µl serum + 275 µl analysbuffert).
- Låt påsen med belagda remsor stabilisera sig vid en temperatur på 18–25 °C innan den öppnas. Ta ut Stripwellramen och det antal remsor med beläggning som behövs från förpackningen (se tabellen). Förpackningar med oanvända remsor måste återförslutas helt och innehålla torkmedel.
- Placera önskat antal belagda remsor i Stripwellramen alldeles innan de ska användas. Märk remsorna för att undvika att de av misstag blandas ihop om de tas bort från Stripwellramen.
- Tillsätt 100 µl standard, kontroll eller utspätt serumprov i varje brunn på remsorna med beläggning. Slutför detta steg inom 30 minuter.
- Inkubera i 120 ± 5 minuter vid en temperatur på 18–25 °C.

## Tvättsteget (1)

- Bered den rätta mängden 1x tvättbuffert (se tabell) genom att späda 10x tvättbuffertkoncentrat 1:10 med avjoniserat vatten. Förvara vid 18–28 °C. Använd 1x tvättbufferten inom 21 dagar från beredningen.
- Vänd/töm remsorna för hand. Tillsätt minst 300 µl 1x tvättbuffert i varje brunn och vänd/töm remsorna för hand. Upprepa ytterligare två gånger (totalt tre tvättningar). Torka av remsorna ordentligt på pappershanduker efter den sista tvättningen.

## Antikroppsinkubering

- Tillsätt 100 µl kanin-anti-CICP till varje brunn.
- Inkubera i 45–50 minuter vid en temperatur på 18–25 °C.
- Bered enzymkonjugatet under inkuberingen. Rekonstituera alla flaskor med enzymkonjugat (se tabellen) med 7 ml 1X-tvättbuffert. Blanda omsorgsfullt. Använd inom 2 timmar.

## Tvättsteget (2)

- Vänd/töm remsorna för hand. Tillsätt minst 300 µl 1x tvättbuffert i varje brunn och vänd/töm remsorna för hand. Upprepa ytterligare två gånger (totalt tre tvättningar). Torka av remsorna ordentligt på pappershanduker efter den sista tvättningen.

## Enzymkonjugatinkubering

- Tillsätt 100 µl rekonstituerat enzymkonjugat i varje brunn.
- Inkubera i 45–50 minuter vid en temperatur på 18–25 °C.
- Bered arbetssubstratlösningen under inkuberingen. Lägg en substrattablett i varje flaska substratbuffert vid 18–25 °C (se tabellen). Låt tabletten lösas upp i 30 till 60 minuter. Skaka flaskan/flaskorna kraftigt så att lösningen blandas helt. Använd inom 1 timme.

## Tvättsteget (3)

- Vänd/töm remsorna för hand. Tillsätt minst 300 µl 1x tvättbuffert i varje brunn och vänd/töm remsorna för hand. Upprepa ytterligare två gånger (totalt tre tvättningar). Torka av remsorna ordentligt på pappershanduker efter den sista tvättningen.

## Substratinkubering

- Tillsätt 100 µl arbetssubstratlösning i varje brunn.
- Inkubera i 30–35 minuter vid en temperatur på 18–25 °C. Om rumstemperaturen inte kan hållas mellan 18 och 25 °C, och absorbanserna under 2,0 inte är kompatibla med plattläsaren, ska substratets utveckling i standard F-brunnarna övervakas. När den optiska densiteten når 1,2–1,5 ska reaktionen stoppas och remsan eller remsorna avläsas.

## Stopp/avläs

- Tillsätt 50 µl stopplösning till varje brunn för att stoppa reaktionen.
- Avläs den optiska densiteten vid 405 nm. Kontrollera att det inte finns några stora bubblor i brunnarna och att remsornas undersidor är rena. Remsorna ska avläsas inom 15 minuter från det att stopplösningen tillsatts.
- Använd en kvantitativ programvara, som använder en kurvpasningsekvation med 4-parameterkalibrering (se nedan) för att analysera analysresultat från MicroVue CICP.  
Ekvation:  $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$
- Avgör koncentrationen i prover och kontrollvätskor från standardkurvan.  
Späd prover som är större än 80 ng/ml i analysbufferten och testa om. Kontrollvärdena ska ligga inom det område som anges i det medföljande analyscertifikatet.

## KVALITETSKONTROLL

Analyscertifikatet som medföljer produkten är partispecifikt och ska användas för att intyga att laboratoriets resultat liknar dem som erhålles på Quidel Corporation. De optiska densitetsvärdena är givna och ska endast användas som riktlinjer. Resultatet i ett laboratorium kan avvika.

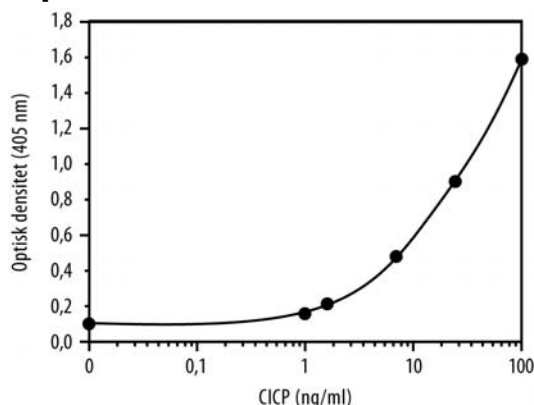
Kvalitetskontrollområden medföljer. Kontrollvärdena är avsedda att bekräfta kurvans och testresultatets giltighet. Varje laboratorium ska upprätta egna parametrar för vad som är acceptabla analysvärden. Om kontrollvärdena INTE ligger inom laboratoriets acceptansgränser, ska analysresultaten ifrågasättas och proverna upprepas.

Om den optiska densiteten för MicroVue CICIP-standard F är mindre än 0,8, ska resultatet ifrågasättas och proverna bör upprepas.

## RESULTATTOLKNING

Provresultaten måste korrigeras för den utförda spädningen. Om provet späddes i förhållandet 1:12 ska ng/ml-värdet multipliceras med 12 för att få slutresultatet för serum-CICP i ng/ml.

### Representativ standardkurva



## EXEMPEL PÅ VÄRDEN

Vid vår test av 279 vuxna personer över 25 år låg de värden som erhöles med kit MicroVue CICIP mellan 69 och 163 ng/ml. Vid vår test av 370 barn i åldrarna 4-18 år låg de erhållna CICIP-värdena vid mellan 110 och 966 ng/ml, med ett medelvärde på 326 CICIP ng/ml.

Värdena kan påverkas av sådana faktorer som tillväxt, låg östrogenproduktion, lågt kalciumintag eller låg fysisk aktivitetsnivå. Östrogenbrist hos postmenopausala kvinnor kan leda till en förhöjd benomsättning, och därmed till kollagenproduktion. Varje laboratorium bör fastställa egna referensområden.

## TESTPRESTANDA

### Antikropparnas specificitet

Anti-CICIP-antikropparna har utvecklats mot CICIP härlett från humana fibroblastceller i odling. Antikropparna uppvisar en korsreaktivitet på 100 % med CICIP i humant serum.

### Detekteringsgränser

MicroVue CICIP-analysens minsta analytiska avkänningsgräns är 0,2 ng/ml, vilket avgörs av den övre 3-SD-gränsen i en studie med nollstandard.

## Precision

Precisionen inom körningar och mellan körningar bestämdes genom analys av tre serumprover. Typiska resultat visas nedan.

CICP (ng/ml)	CV % inom test <sup>1</sup>	CV % inom test <sup>2</sup>
80,8	6,8	7,0
98,1	5,5	7,2
296,7	6,6	5,0

<sup>1</sup> n = 20 upprepningar    <sup>2</sup> n = 3 i 3 tester

## Återhämtning – linjäritet

Linjäriteten avgjordes genom att prover späddes seriellt. De observerade värdena jämfördes med förväntade värden. Typiska resultat visas nedan.

Prov	Spädningsfaktor	Observerad (ng/ml)	Förväntad (ng/ml)	Återhämtning (%)
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

## Återhämtning – pik-återhämtning

Pik-återhämtningen avgjordes genom att en känd mängd renat CICIP tillsattes i serumprover med olika nivåer endogent CICIP. Normalresultaten redovisas nedan.

Prov	Endogent (ng/ml)	Tillsatt (ng/ml)	Observerad (ng/ml)	Återhämtning (%)
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

## SUPPORT

Utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidelprodukter. Ytterligare information om Quidel, våra produkter eller distributörer finns på vår hemsida [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## REFERENSER

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)

---

## ORDLISTA



Se handhavandebeskrivningen sur CDROM

---

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



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA | [www.quidel.com](http://www.quidel.com)



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany