

Urine CrossLaps[®] (CTX-I) EIA

For the quantification of degradation products of C-terminal telopeptides of Type I collagen in human urine

Pour la quantification des produits de dégradation des telopeptides C-terminaux du collagène de type I dans l'urine humaine

Zur quantitativen Bestimmung von Degradationsprodukte der C-terminalen Telopeptiden von Typ-I Kollagen aus humanem Urin

Kit per il dosaggio quantitativo dei prodotti di degradazione del telopeptide C-terminale del collagene umano di tipo I nelle urine

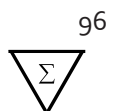
Cuantificación de la degradación de productos del telopéptido C-terminal procedente del colágeno Tipo-I en orina humana

Para a quantificação de produtos de degradação de telopeptídeos C-Terminais do colágeno Tipo-I em urina humana.

Example Version



REF AC-03F1



English	3
Français.....	15
Deutsch.....	21
Italiano	27
Español.....	33
Português.....	39

Immunodiagnostic Systems Limited is not responsible for any other use of the kit or consequence hereof than the one specified above. Neither for misuse, e.g. use deviating from the procedure described in this manual. Furthermore, Immunodiagnostic Systems Limited is not to be made responsible for any diagnoses or conclusions made by the user or third party based on the results obtained with the Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA kit nor for any consequences such interpretations may cause.

Immunodiagnostic Systems Limited dégage sa responsabilité de toute utilisation du kit autre que celle décrite dans le manuel et des conséquences pouvant en découler. De même pour toute adaptation du protocole tel que décrit dans ce manuel.

Immunodiagnostic Systems Limited ist nicht verantwortlich für ein missbräuchliche Verwendung des Kits, der abweicht von dem, worüber in diesem Handbuch geschrieben wurde. Desweiteren kann Immunodiagnostic Systems Limited nicht verantwortlich gemacht werden für eine Diagnose oder Schlussfolgerung, die von Benutzern oder Dritte basierend auf die Ergebnisse erhalten mit Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA gemacht wurden oder für jegliche Konsequenzen, die solche Interpretationen verursachen.

Immunodiagnostic Systems Limited non è responsabile per ogni uso diverso del kit, né per le eventuali conseguenze da ciò provocate, né per un uso errato del kit per non aver seguito correttamente le istruzioni contenute in questo manuale. Inoltre, Immunodiagnostic Systems Limited non può essere ritenuta responsabile per ogni diagnosi o conclusione fatta dall'utilizzatore o da altri, basata sui risultati ottenuti con il kit Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA, né per le eventuali conseguenze che tale interpretazione possa provocare.

Immunodiagnostic Systems Limited Não se responsabilizará pela utilização inadequada do kit, isto é: utilização que difere do procedimento descrito neste manual. Desta forma, a Immunodiagnostic Systems Limited não pode ser responsabilizada por quaisquer diagnósticos ou conclusões realizadas pelo médico e/ou usuário do kit ou por quaisquer conseqüências que estas interpretações possam causar.

INTRODUCTION

Intended use

The Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA is an enzyme immunosorbent assay for quantitative determination of degradation products of C-terminal telopeptides of Type-I collagen in human urine.

The Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA assay is intended for *in vitro* diagnostic use as an indication of human bone resorption and may be used as an aid in

A. Monitoring bone resorption changes of

- 1) Anti-resorptive therapies in postmenopausal women:
 - a) Hormone Replacement Therapies (HRT) with hormones and hormone like drugs.
 - b) Bisphosphonate therapies.
- 2) Anti-resorptive therapies in individuals diagnosed with osteopenia:
 - a) Hormone Replacement Therapies (HRT) with hormones and hormone like drugs.
 - b) Bisphosphonate therapies.

B. Predicting skeletal response (Bone Mineral Density) in postmenopausal women undergoing anti-resorptive therapies

- a) Hormone Replacement Therapies (HRT) with hormones and hormone like drugs.
- b) Bisphosphonate therapies.

Limitations

The use of the test has not been established to predict the development of osteoporosis or future fracture risk. The use of the test has not been established in hyperparathyroidism or hyperthyroidism. When using the test to monitor therapy, results may be confounded in patients afflicted with clinical conditions known to affect bone resorption e.g. bone metastases, hyperparathyroidism or hyperthyroidism.

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA results should be interpreted in conjunction with clinical findings and other diagnostic results and should not be used as a sole determinant in initiating or changing therapy. Do not interchange Serum CrossLaps® (CTX-I)EIA values with Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA values.

Summary and explanation of the test

Type I collagen accounts for more than 90% of the organic matrix of bone and is synthesized primarily in bone (1). During renewal of the skeleton, Type-I collagen is degraded, and small peptide fragments are excreted into the urine. These fragments can be measured by Urine CrossLaps® EIA as has been reported as useful for follow up of anti resorptive treatment of patients with metabolic bone diseases (2-17).

Principle of the procedure

The Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA assay is based on the competitive binding of the anti-CrossLaps antibodies to either soluble CrossLaps antigen or to CrossLaps antigen-coated micro-titre wells.

Standards, controls, or unknown samples are pipetted into the appropriate microtiter wells. Then the anti-CrossLaps antibodies are added and incubation takes place for 1 hour at 18-22°C. The wells are washed and peroxidase conjugated anti-rabbit immunoglobulin is added. The wells are then incubated again for 1 hour at 18-22°C. After a second washing step the wells are incubated for 15 min with a chromogenic substrate. The reaction is stopped and the absorbance is measured.

PRECAUTIONS

The following precautions should be observed in the laboratory:

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where immunodiagnostic materials are being handled
- Do not pipette by mouth
- Wear gloves when handling immunodiagnostic materials and wash hands thoroughly afterwards
- Cover working area with disposable absorbent paper

Warnings

For *in vitro* use only.

- All reagents and laboratory equipment should be handled and disposed of as if they were infectious
- Do not use kit components beyond the expiry date and do not mix reagents from different lots

Storage

Store the Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA kit upon receipt at 2-8°C. Under these conditions the kit is stable up to the expiry date stated on the box.

MATERIALS

Specimen collection

For optimal results it is recommended to use urine from second morning void. Also for monitoring the individual patient, follow up samples should be collected under same conditions as the baseline sample. Levels of the peptide measured by the Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA in urine do not vary with dietary intake, however for consistency, it is recommended to use second morning void. Also for monitoring the individual patient, follow-up samples should be collected under same conditions as the baseline sample (i.e. second morning void).

Please note that for optimal results it is recommendable to centrifuge the samples (e.g. 2000g; 10 min). Keep the urine sample refrigerated (2-8°C) for storage less than one week, or freeze the sample (<-18°C) for longer storage.

Specimen obviously contaminated with whole blood may interfere with assay performance. These specimens should be discarded and a specimen recollected.

Materials supplied

Before opening the kit, please read the section on **Precautions**. The kit contains reagents sufficient for 96 determinations.

Immunostrips MICROPLAT

Microwell strips (12 x 8 wells each) pre-coated with CrossLaps antigen. Supplied in a plastic frame.

CrossLaps Standard CAL 0

One vial (min. 11.0 mL) of ready-for-use buffer solution with protein stabilizer, detergent and preservative.

CrossLaps Standards CAL 1-5

Five vials (min. 0.4 mL/vial) of ready-for-use CrossLaps standard in buffer solution with protein stabilizer, detergent and preservative. The exact value of each Standard is printed on the QC Report.

Urine Controls CTRL 1-2

Two vials (min. 0.4mL/vial) of ready-for-use human urine in buffer solution with protein stabilizer, detergent and preservative. The exact value of each Control is printed on the QC Report.

Primary Antibody Solution AB

One vial (min. 12.0 mL) of ready-for-use anti- CrossLaps antibodies raised in rabbits. Prepared in buffer solution with protein stabilizer, detergent and preservative.

Peroxidase Conjugated Antibody ENZYMCNJ

One vial (min. 12.0 mL) of ready-for-use horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies in buffer solution with protein stabilizer, detergent and preservative.

Substrate Solution SUBS TMB

One vial (min. 12.0 mL) of ready-for-use tetramethylbenzidine (TMB) substrate in an acidic buffer. Please note that the chromogenic substrate might appear slightly bluish.

Stopping Solution H₂SO₄

One vial (min. 12.0 mL) of ready-for-use 0.18 mol/L sulfuric acid.

Washing Solution WASHBUF 50x

One vial (min. 20.0 mL) of concentrated washing buffer solution with detergent and preservative. Dilute 1+50 before use.

Sealing tape

Adhesive film for covering wells during incubation.

Materials required — not supplied

- Container for preparing the Washing Solution
- Precision micropipettes to deliver 15 µL
- Distilled water
- Precision 8- multipipette to deliver 100 µL
- Microwell mixing apparatus (300 rpm)
- Microtiter plate reader

ASSAY PROCEDURE

Assay Procedure

For optimal performance of the assay it is important to comply with the instructions given below. Prior to use, prepare and equilibrate all solutions to room temperature. **Perform the assay at 18-22°C.**

Determine the number of strips needed for the assay. It is recommended to test all samples in duplicate. In addition, for each run a total of 16 wells are needed for standards and control. Place the appropriate number of strips in the plastic frame. Store unused immunostrips in the tightly closed foil bag with desiccant capsules.

1 Pipette Standards or samples

Pipette 15 µL of **Standards** [CAL 0-5], **Controls** [CTRL 1-2] or unknown samples into appropriate wells.

2 Incubation in Immunostrips

Add 100 µL **Primary Antibody Solution** [AB] to each well. Cover the immunostrips with sealing tape and incubate for 60±5 minutes at 18-22°C on a microtiter plate mixing apparatus (300 rpm).

3 Washing

Wash the immunostrips 5 times manually with 300 µL diluted **Washing Solution** ([WASHBUF 50x diluted 1+50 in distilled water]).

Using an automatic plate washer, follow the instructions of the manufacturer or the guidelines of the laboratory. Usually, 5 washing cycles are adequate. Make sure that the wells are completely emptied after each manual or automatic washing cycle.

4 Incubation with Peroxidase Conjugated Antibody

Add 100 µL of **Peroxidase Conjugated Antibody** [ENZYMCONJ] to each well, cover with sealing tape, and incubate for 60±5 minutes at 18-22°C on the mixing apparatus (300 rpm).

5 Washing

Proceed as described in step 3.

6 Incubation with chromogenic substrate solution

Pipette 100 µL of the **Substrate Solution** [SUBS TMB] into each well, cover with sealing tape, and incubate for 15±2 minutes at 18-22°C in the dark on the mixing apparatus (300 rpm).

Do not pipette directly from the vial containing TMB substrate but transfer the needed volume to a clean reservoir. Remaining substrate in the reservoir should be discarded and not returned to vial.

7 Stopping of color reaction

Pipette 100 µL of **Stopping Solution** [H₂SO₄] into each well.

8 Measurement of absorbance

Measure the absorbance at 450 nm with 650 nm as reference within two hours.

Limitations of the procedure

If the absorbance of a sample exceeds that of **Standards 5**, the sample should be diluted in **Standard 0** and re-analysed.

QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analyzed with appropriate statistical methods.

RESULTS

Calculation of results

- Calculate the mean of the duplicate absorbance determinations. Construct a standard curve on log-linear graph paper by plotting the mean absorbencies of the six Standards (ordinate) against the corresponding CrossLaps concentrations (abscissa). Draw the best fitting curve. Alternatively, a four-parametric logistic curve fit can be used
- Determine the CrossLaps concentration of the Controls and each patient samples by interpolation

Example of results obtained:

Standards/ Controls/ Samples	CrossLaps Conc. (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Mean A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolated CrossLaps Conc. (µg/L)
Standard 0	0	1.950 / 2.027	1.989	
Standard 1	75	1.599 / 1.705	1.652	
Standard 2	250	1.236 / 1.275	1.256	
Standard 3	750	0.785 / 0.850	0.818	
Standard 4	2250	0.472 / 0.496	0.484	
Standard 5	6750	0.267 / 0.285	0.276	
Control 1		0.643 / 0.671	0.657	1193
Control 2		0.440 / 0.468	0.454	2462
Sample I		1.161 / 1.202	1.182	305
Sample II		0.729 / 0.765	0.747	919
Sample III		0.423 / 0.422	0.423	2829

Please note: The data above are for illustration only and should not be used to calculate the results of any run.

Calculation of corrected CrossLaps value

For each sample the CrossLaps concentration (µg/L) and the creatinine concentration (mM=mmol/L) should be determined. For determination of creatinine the method by Jaffe (3) or equivalent is recommended.

The following equation corrects the CrossLaps concentration for variation in urine concentration:

$$\text{Corr. CrossLaps Value (µg/mmol)} = \frac{\text{CrossLaps (µg/L)}}{\text{Creatinine (mM)}}$$

Performance characteristics

All performance data have been established using second morning void urine samples unless otherwise indicated.

Detection limit: 50 µg/L

This is the concentration corresponding to two standard deviations below the mean of 21 determinations of "CrossLaps Standard 0".

Precision

The following results were obtained when assaying five replicates of four samples each day in five consecutive days (25 determinations in total for each sample).

InterAssay Variation (n=25)

Mean (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	13.68	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

IntraAssay Variation (n=25)

Mean (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

Dilution/Linearity

The Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA is linear in the range 50 µg/L to 6750 µg/L of CrossLaps.

Urine samples with the concentration of 3450-4340 µg/L CrossLaps were diluted with standard 0 and the concentration of CrossLaps were determined with Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA. The urine neat sample is set to 100%.

Sample	Dilution	Expected µg/L	Measured µg/L	Corrected µg/L	Recovery %
1	neat	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	neat	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	neat	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
Mean					101

Recovery

Spiked samples were prepared by adding varying amounts of the CrossLaps antigen to three different urine specimens.

Sample	Initial µg/L	Added µg/L	Expected µg/L	Measured µg/L	Recovery %
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
Mean					96

Expected values

It is advisable for a laboratory to establish its own range of normal and pathological values. As an example, the mean values and standard deviations for various populations are given below; all values have been established using second morning void samples.

For further reading, please refer to the reference list.

Populations	Number of subjects	Mean Values Urine CrossLaps ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)
Pre-menopausal women	175	191	67 – 544
Post-menopausal women	250	324	121 – 874
Males	249	174	54 - 559

Day to Day Intra-individual Variation:

The Day to Day Intra-individual Variation was assessed by analyzing urine samples (second morning void) from 14 healthy post menopausal women at five time points over 2 weeks.

Urine CrossLaps [®] EIA [$\mu\text{g}/\text{mmol creatinine}$]								
Woman no	Age	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5	Mean	SD
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
Mean	68							16
SD	7.80							10.87

CLINICAL DATA

The Urine CrossLaps[®] (CTX-I) EIA has been used to monitor treatment in several clinical studies and the CrossLaps values have been compared to Bone Mineral Density ($\text{BMD}_{\text{spine}}$) measurements.

All the clinical studies presented below were performed according to the European Standard for good clinical practice (GCP and GLP). Most of the clinical studies presented here were conducted on white Danish women. However, several studies have been published showing that other demographic groups display similar CrossLaps decrease in response to anti-resorptive therapies (6-16). The Paget's disease study was performed on a French population.

For all the data presented below second morning void samples have been used.

The Bone mineral density was measured at the Lumbar spine (L1 - L4). The change in the bone mineral density is presented below as $\alpha\text{-BMD}$. $\alpha\text{-BMD}$ is defined as the slope of the linear regression line for $\text{BMD}_{\text{spine}}$ versus time (years) for the period of treatment. In most cases the calculation of $\alpha\text{-BMD}$ involves a minimum of 5 $\text{BMD}_{\text{spine}}$ measurements. The $\alpha\text{-BMD}$ thus represents the % change in $\text{BMD}_{\text{spine}}$ per year. Because there to this date is no universal agreement as to what constitutes positive BMD response we have calculated the sensitivity and specificity using two different cut-off values for $\alpha\text{-BMD}$; $\alpha\text{-BMD}>0$ and $\alpha\text{-BMD}>1$. The sensitivity is defined as the percent of the study population with a positive BMD response and who have a % change from baseline of Urine CrossLaps[®] EIA which is 40% or greater. The specificity is defined as the percent of the study population without a positive BMD response and who have a % change from baseline of Urine CrossLaps[®] EIA that is less than 40%.

Bisphosphonate studies

Below is shown the Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA data [$\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine] from two different bisphosphonate studies. For the mean values the observed ranges (95% confidence interval) are noted in parentheses.

Alendronate

- Women between age 40 and 59 years, 6 months to 3 years since menopause
- 12 participants on placebo (500 mg calcium)
- 40 participants on active treatment: (5 mg (n=14), 10 mg (n=13), 20 mg (n=13)) alendronate and 500 mg calcium
- Treatment period: 2 - 3 years

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA

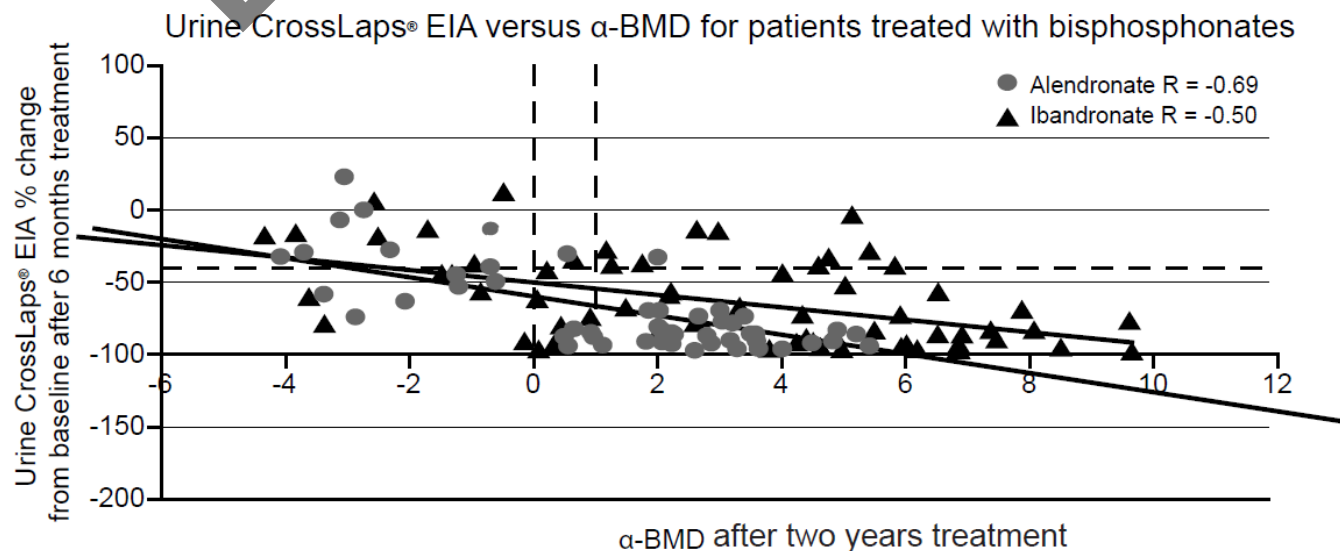
	Placebo group		Alendronate group	
	Mean ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)	Mean ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)
Baseline	387	300 – 499	412	367 – 462
after 6 months treatment	250	176 – 357	55	43 – 71

Ibandronate

- Women less than 75 years, more than ten years after menopause and have a BMD forearm 1.5 SD or more below the standard for healthy pre-menopausal women
- 25 participants on placebo (1000 mg calcium)
- 41 participants on active treatment: (2.5 mg (n=23), 5 mg (n=18)) ibandronate and 1000 mg calcium
- Treatment period: 1 year

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA

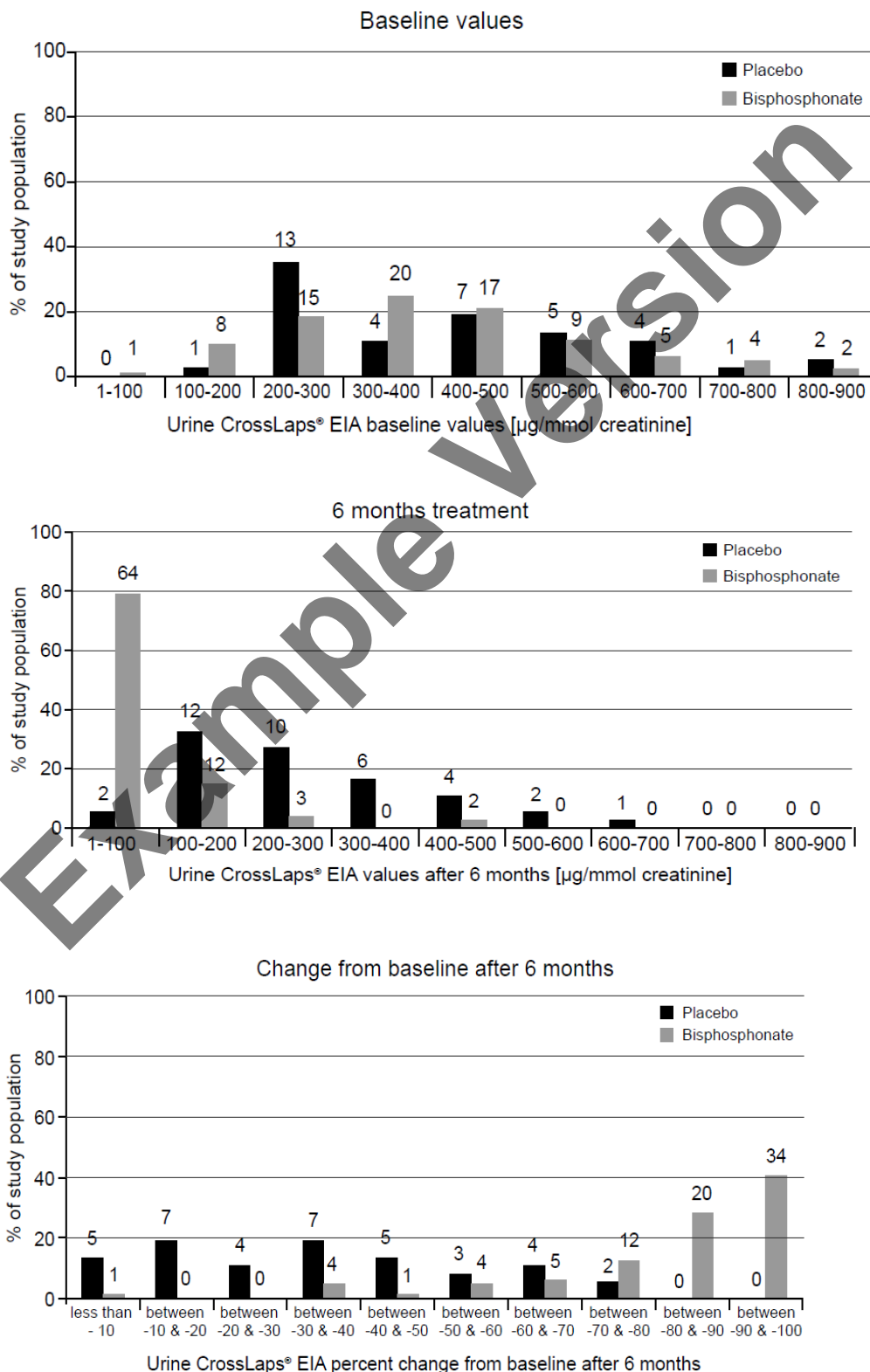
	Placebo group		Ibandronate group	
	Mean ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)	Mean ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmolL}$)
Baseline	377	319 – 445	337	278 – 290
after 6 months treatment	231	184 – 290	41	30 – 57



Using a cut-off for Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA of 40% change from baseline the following sensitivities, and specificities and 95% confidence intervals are obtained. Below is indicated the actual fractions:

	Ibandronate		Alendronate	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
α -BMD>0	95% (88 - 102)	57% (31 - 83)	79% (68 - 90)	54% (27 - 81)
α -BMD>1	97% (91 - 103)	45% (23 - 67)	78% (66 -90)	38% (17 - 59)

Below are shown distribution plots for the combined bisphosphonate studies. The number over each bar indicates the number of participants in each class.



HRT studies

Below is shown Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA [mg/mmol creatinine] data from three different HRT studies.

Tibolone

- Women less than 75 years and more than ten years after menopause
- 13 participants on placebo (400 mg calcium/day)
- 57 participants on active treatment: (1.25 mg (n=29), 2.5 mg (n=28)) Org OD14 and 400 mg calcium/day
- Treatment period 2 years

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA

	Placebo group		Tibolone group	
	Mean (µg/mmol)	95% Confidence Interval (µg/mmol)	Mean (µg/mmol)	95% Confidence Interval (µg/mmol)
Baseline	259	212 – 315	317	287 – 350
after 6 months treatment	214	174 – 262	99	82 – 119

HRT I

- Women more than 45 years, 1 to 6 years since menopause
 - 42 participants on placebo (400 mg calcium/day)
 - 125 participants on active treatment:

Days 1-16	Days 17-28
34; E 1mg	E 1mg + G 25 µg
29; E 2mg	E 2mg + G 25 µg
28; E 2mg	E 2mg + G 50 µg
34; E 1mg + G 25 µg	E 1mg + G 25 µg
- E = estradiol-15β, G = gestodene, active treatment also receive 400mg calcium/day
- Treatment period: 2 years

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA

	Placebo group		HRT I group	
	Mean (µg/mmol)	95% Confidence Interval (µg/mmol)	Mean (µg/mmol)	95% Confidence Interval (µg/mmol)
Baseline	352	308 – 402	332	312 – 353
after 6 months treatment	361	318 – 411	122	109 – 135

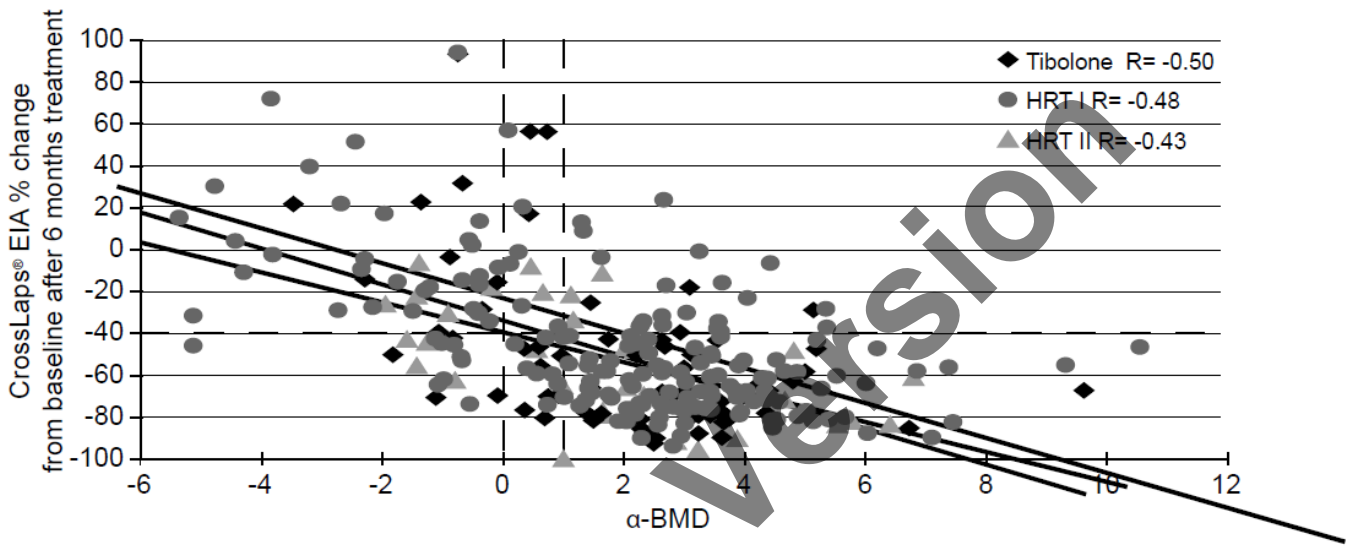
HRT II

- Women between 65 and 70 years and BMC forearm below 1SD of healthy pre-menopausal women
- 19 participants on placebo (1000 mg calcium/day)
- 17 participants on active treatment: 50 µg estradiol, 1 mg norethisterone and 1000 mg calcium/day
- Treatment period: 2 years

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA

	Placebo group		HRT II group	
	Mean (µg/mmoL)	95% Confidence Interval (µg/mmoL)	Mean (µg/mmoL)	95% Confidence Interval (µg/mmoL)
Baseline	251	206 – 305	217	163 – 291
after 6 months treatment	148	107 – 205	51	33 – 77

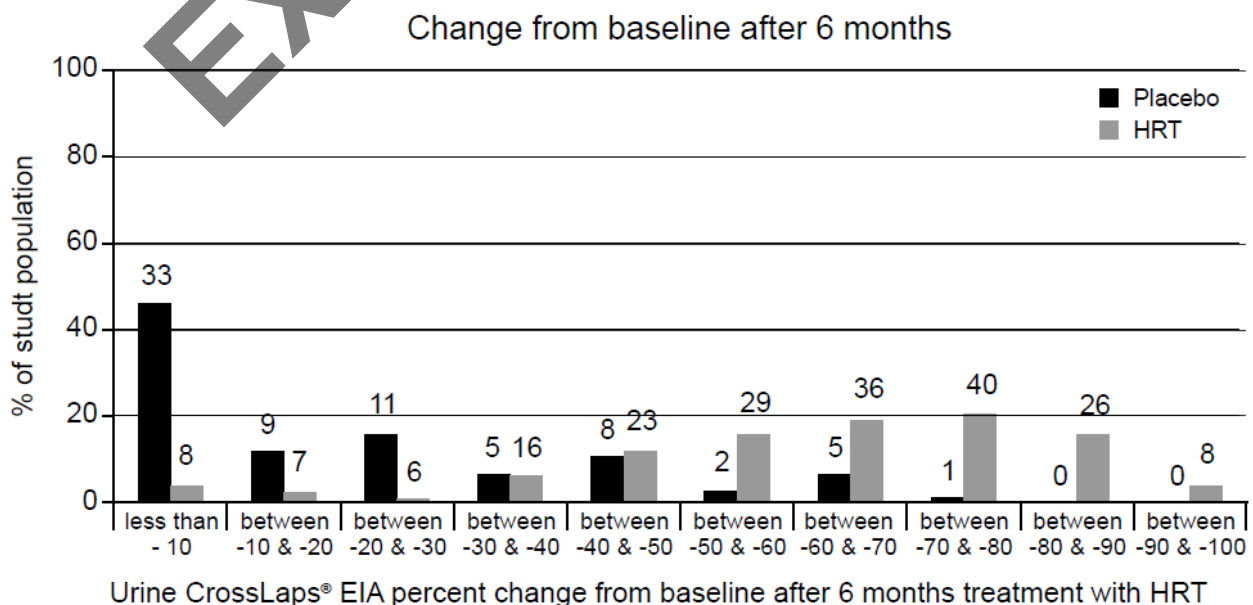
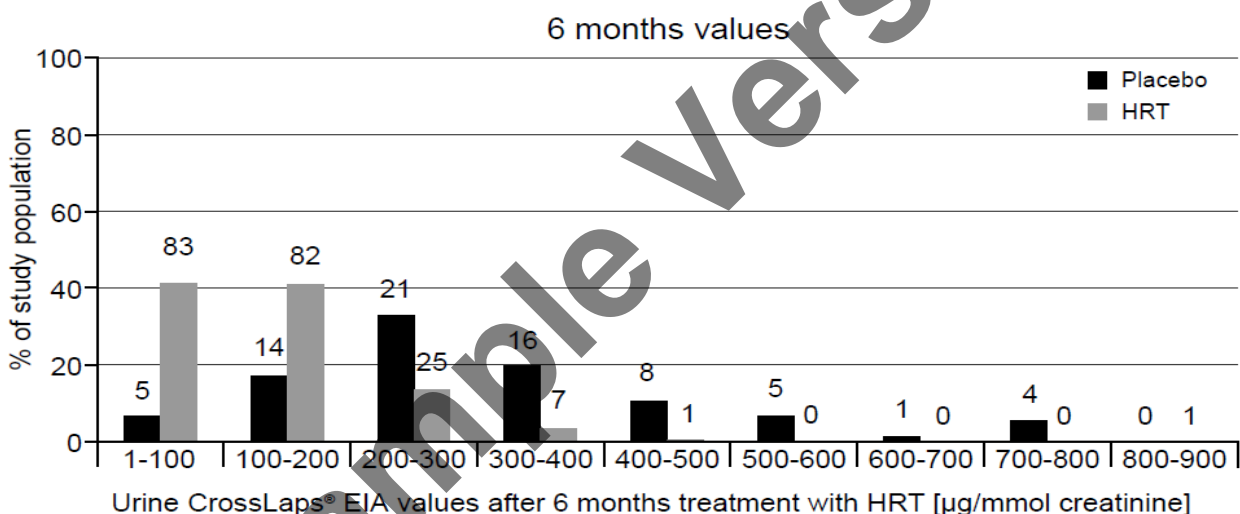
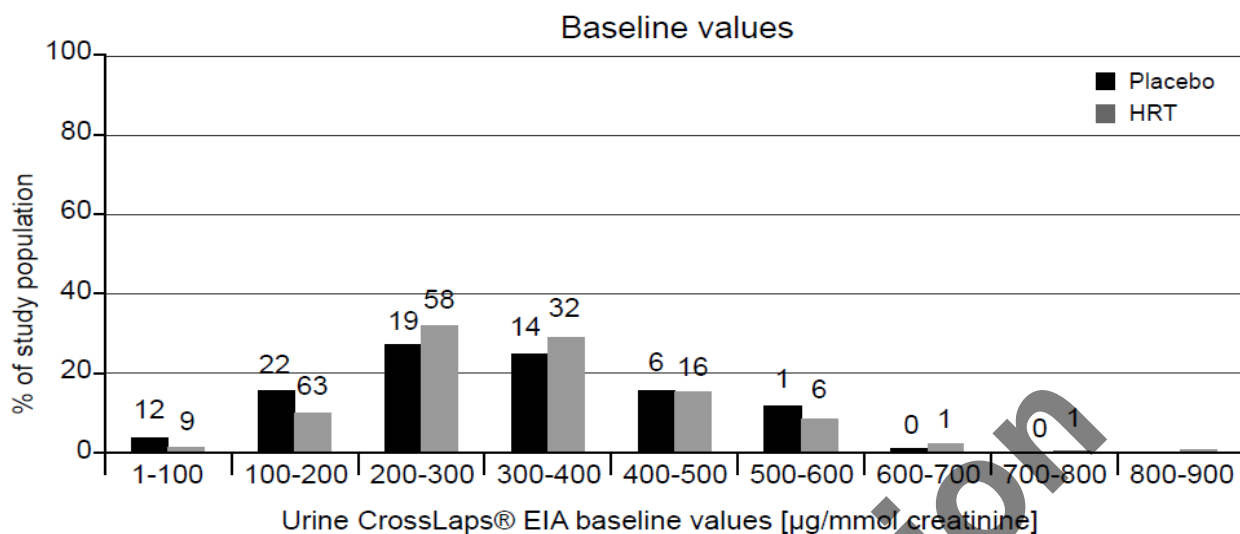
Urine CrossLaps® EIA versus α-BMD for patients treated with HRT



Using a cut-off for Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA of 40% change from baseline the following sensitivities, specificities and 95% confidence intervals are obtained

	Tibolone		HRT I		HRT II	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
α-BMD>0	88% (80-96)	69% (44-96)	80% (73-87)	80% (68-92)	78% (92-94)	54% (24-88)
α-BMD>1	91% (83-99)	50% (30-70)	83% (76-90)	71% (59-83)	83% (68-98)	54% (27-81)

Below is a shown distribution plot for the combined HRT studies. The number over each bar indicates the number of participants in each class



Paget's disease

Below is shown the Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA data [mg/mmol creatinine] from a Paget's disease study.

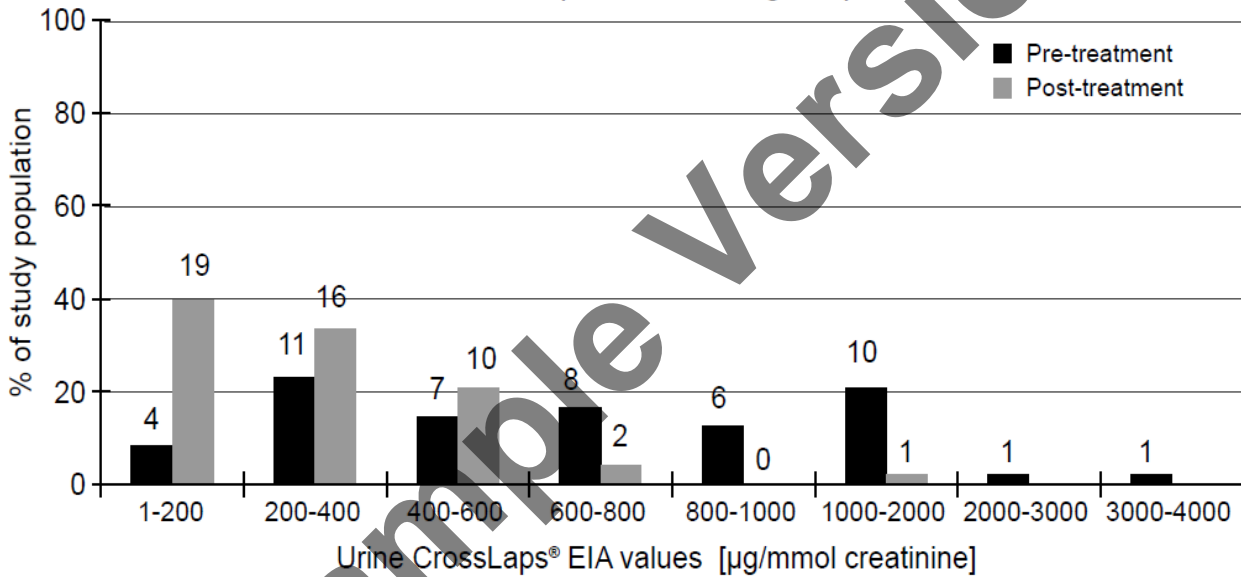
- Men and woman with Paget's disease documented by X-ray and bone scan
- 48 patients on active treatment: IV pamidronate, 3 injections of 60 mg
- Treatment period: 3 days

Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA

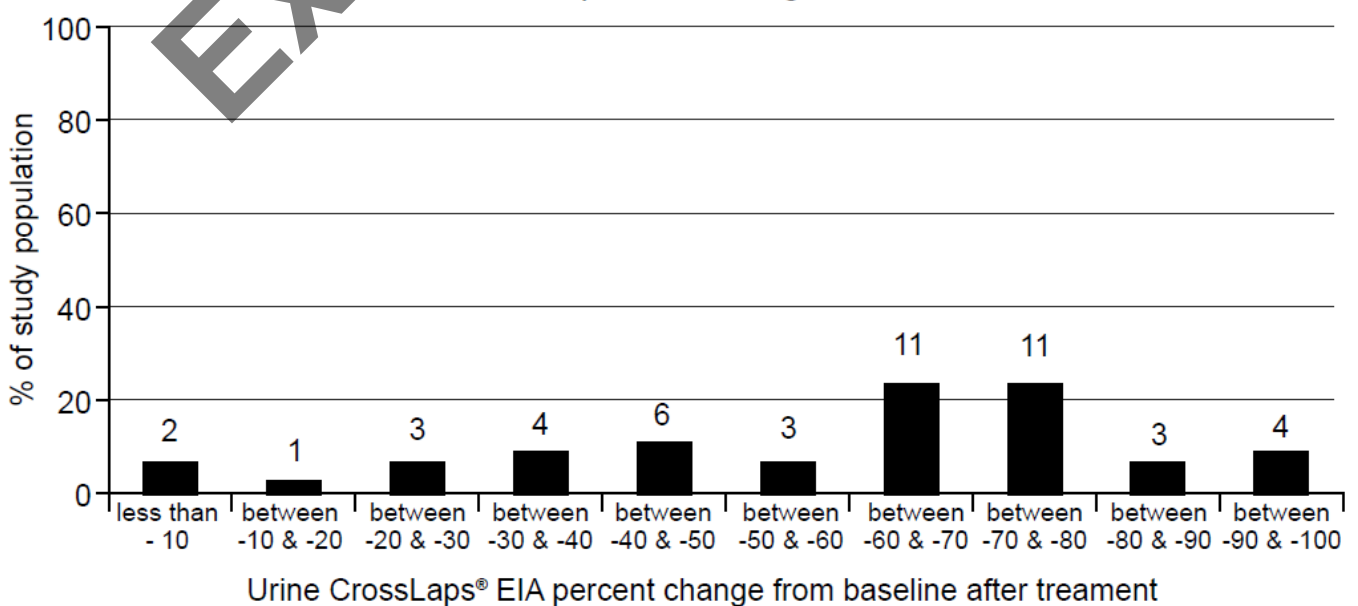
	Pre treatment group		Post treatment group	
	Mean (µg/mmoL)	95% Confidence Interval (µg/mmoL)	Mean (µg/mmoL)	95% Confidence Interval (µg/mmoL)
Baseline	580	466 – 722	191	141 – 259

Below are shown distribution plots for the Paget's disease study. The number over each bar indicates the number of participants in each class.

Urine CrossLaps® EIA for Paget's patients



Urine CrossLaps® EIA change from baseline



INTRODUCTION

But du dosage

Le Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA est une trousse pour le dosage immunoenzymatique d'une séquence C-terminal spécifique du collagène de type I dans les urines humaines. Elle a fait l'objet d'un enregistrement en France auprès de l'Agence du Médicament sous la référence T88412. Le Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA a été développé pour un usage diagnostique in vitro ; il indique le degré de résorption des os humains et peut être utilisé en particulier dans les contextes suivants.

A. La mise en évidence des changements de la résorption osseuse en cas de :

1. Thérapie anti-résorptive chez la femme ménopausée
 - a) Hormono-thérapie avec hormone ou analogue d'hormone
 - b) Thérapies aux bisphosphonates
2. Thérapies anti-résorptives chez les individus ostéopéniques
 - a) Hormono-thérapie avec hormone ou analogue d'hormone
 - b) Thérapies aux bisphosphonates

B. Prédiction de la réponse en terme de masse osseuse (Densité Minérale Osseuse) chez la femme post-ménopausée et suivant une thérapie anti-résorptive

- a) Hormono-thérapie avec hormone ou analogue d'hormone.
- b) Thérapies aux bisphosphonates

Limitations

Le test n'a pas été validé pour prédire le développement de l'ostéoporose ou un futur risque de fracture. Il n'a pas été validé dans l'hyper-parathyroïdisme ou l'hyperthyroïdisme. Dans le cadre de suivi de thérapie, les résultats du test doivent être confrontés aux données cliniques connues pouvant affecter la résorption osseuse telles que la présence de métastases osseuses, l'hyper-parathyroïdisme ou l'hyperthyroïdisme.

Les résultats du kit Urine CrossLaps® (CTX-I)EIA doivent être interprétés avec les données cliniques et diagnostiques disponibles et ne doivent pas être utilisées seules pour décider d'un changement de thérapie. Ne pas échanger les données obtenues avec le kit Serum CrossLaps® (CTX-I) EIA et le kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA

Résumé

Le collagène de type I compte pour plus de 90% de la matrice organique osseuse et est synthétisé prioritairement par l'os. Pendant le renouvellement du squelette, ce collagène de type I est dégradé et de petits fragments de peptides provenant de l'os sont retrouvés dans la circulation sanguine. Ces fragments peuvent être dosés à l'aide de la trousse Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA L'utilisation de ce kit a été décrite dans le suivi des traitements anti-résorptifs de patients avec désordres osseux métaboliques.

Principe du dosage

La trousse Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA est basée sur la compétition entre l'anticorps anti-Crosslaps avec soit l'antigène soluble, soit l'antigène recouvrant les cupules des micro plaques. Les standards, contrôles et échantillons sont distribués dans les micro-puits. L'anticorps anti-Crosslaps est alors ajouté. Après une incubation d'une heure à 18-22°C, les micro-puits sont lavés. Un anticorps anti-immunoglobuline de lapin est alors ajouté et incubé 1 heure à 18-22°C. Après un second lavage, les puits sont incubés avec une solution de chromogène (TMB) pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée et l'absorbance mesurée.

PRECAUTIONS

Les précautions suivantes doivent être observées dans le laboratoire :

- Ne pas fumer, boire ou manger dans les locaux où l'on manipule les échantillons ou les réactifs.
- Ne pas effectuer les pipetages à la bouche.
- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs ou des échantillons et se laver soigneusement les mains après.
- Couvrir l'espace de travail avec du papier absorbant jetable.

Avertissements

Pour utilisation *in vitro* uniquement.

- Tous les réactifs, échantillons et équipements de laboratoire doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.

Conservation

Le kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA doit être placé à 2-8°C dès réception. Dans ces conditions, le kit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

MATERIELS

Collecte des échantillons

Les taux de peptide mesurés avec le kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA dans l'urine ne varient pas avec l'absorption de nourriture. Cependant, par souci de cohérence, il est recommandé d'utiliser la seconde miction du matin. Pour le suivi de patients, il est recommandé de prélever les différents échantillons dans les mêmes conditions et à la même heure que le premier échantillon (seconde miction du matin). Pour un résultat optimal il est recommandé de centrifuger les échantillons (2000 g pendant 10 minutes). Conservez les échantillons au réfrigérateur (2-8°C) pour une utilisation dans la semaine ou congelés (-20°C) pour une conservation prolongée.

Les échantillons contaminés par du sang peuvent interférer avec les performances du test. Il est préférable de les écarter et d'utiliser un nouveau prélèvement.

Composition de la trousse

Avant d'ouvrir le kit, veuillez lire le chapitre précautions.

Chaque trousse contient les quantités nécessaires pour 96 tests.

Barrettes de micro puits MICROPLAT

Barrettes de micropuits (12 x 8 puits chacune) pré-enduites d'antigène CrossLaps. Livré dans un cadre en plastique.

Standard CrossLaps CAL 0

e solution prête à l'emploi contenant des protéines stabilisatrices, un détergent et un conservateur.

Standards CrossLaps CAL 1 - 5

5 flacons (min. 0.4mL chacun) de solution prête à l'emploi. Ils contiennent du standard CrossLaps dans une solution tamponnée, des protéines stabilisatrices, un détergent et un conservateur. La valeur exacte de chaque standard est imprimée sur le rapport du contrôle de qualité.

Contrôle urine CTRL 1 - 2

Deux flacon (min. 0.4mL) prêt à l'emploi d'urine humaine dans une solution tamponnée contenant des protéines stabilisatrices, du détergent et un conservateur. La concentration exacte est imprimée sur le rapport du contrôle de qualité.

Solution d'anticorps primaire AB

Un flacon (min. 12.0 mL) d'anticorps de lapin anti-CrossLaps prêt à l'emploi. Préparée dans une solution tamponnée avec des protéines stabilisatrices, un détergent et un conservateur.

Anticorps conjugué à la peroxydase ENZYMCONJ

Un flacon (min. 12.0 mL) prêt à l'emploi. Il contient un anticorps anti-lapin conjugué à la peroxydase dans une solution tamponnée avec des protéines stabilisatrices, un détergent et un conservateur.

Solution substrat SUBS TMB

1 flacon (min. 12 mL) de solution prête à l'emploi. Il contient du substrat tétraméthylbenzidine (TMB) dans une solution acide. La solution de chromogène peut sembler légèrement bleutée.

Solution d'arrêt H₂SO₄

Un flacon (min. 12 mL) d'une solution prête à l'emploi d'acide sulfurique 0,18 mol/l.

Solution de lavage WASHBUF 50x

1 flacon (min. 20 mL) d'une solution de lavage concentrée contenant un détergent et un conservateur. A diluer au 1:50 avant utilisation.

Film adhésif

Film adhésif pour couvrir les micro puits pendant l'incubation.

Matériel et produits nécessaires mais non fournis

- Verrerie standard de laboratoire pour la préparation de la solution de lavage
- Micro pipettes de précision à embouts jetables permettant la distribution de 15 µl
- Eau distillée
- Multipette de précision permettant de distribuer 100 µl
- Agitateur rotatif automatique de micro plaques (300 rpm)
- Lecteur de plaque avec des filtres à 450 nm et 650 nm

PROTOCOLE DU DOSAGE

Pour des performances optimales, il est important de se conformer aux instructions ci-dessous. Avant utilisation, préparer et équilibrer les solutions à température ambiante. Réaliser les techniques à 18-22°C.

Déterminer le nombre de barrettes nécessaire pour le dosage. Il est conseillé de tester les échantillons en double. Il est nécessaire d'utiliser 16 micro puits pour les standards et contrôle lors de chaque technique. Conserver les barrettes de micro puits non utilisées dans les sachets fermés en présence de déshydratant.

1 Distribution des standards et échantillons

Distribuer 15 µL de standards CAL 0-5, de contrôle CTRL 1-2 ou d'échantillon à doser dans les puits.

2 Incubation

Ajouter 100 µL de la solution d'anticorps primaires AB dans tous les puits. Couvrir les puits avec le film adhésif et incuber 60±5 minutes à 18-22°C sur un agitateur de micro plaques (300 rpm).

3 Lavage

Laver les barrettes 5 fois manuellement avec 300 µL la solution de lavage diluée (WASHBUF 50x dilué 1+50 dans l'eau distillée). Dans le cas d'un lavage avec un laveur automatique suivre les instructions du fabricant ou le guide du laboratoire. L'utilisation de 5 cycles de lavage est recommandée. S'assurer que les puits soient complètement vides après chaque série de lavage.

4 Incubation avec l'anticorps conjugué à la peroxydase

Ajouter 100 µL d'anticorps conjugué à la peroxydase ENZYMCNJ dans tous les puits, couvrir avec le film adhésif et incuber 60±5 minutes à 18-22°C sur un agitateur de micro plaques (300 rpm).

5 Lavage

Procéder comme décrit dans l'étape 3

6 Incubation de la solution substrat

Ajouter 100 µL de la solution substrat SUBS TMB dans tous les puits, recouvrir la plaque avec un film adhésif et incuber 15±2 minutes à 18-22°C, à l'abri de la lumière, sous agitation par rotation (300 rpm). Ne pas prélever la solution substrat directement dans le flacon T de TMB mais transférer le volume nécessaire dans un tube propre. Le substrat transféré sera jeté car il ne doit pas être reversé dans le flacon.

7 Arrêt de la réaction colorée

Distribuer 100 µL de solution d'arrêt H₂SO₄ dans chaque puits.

8 Mesure de l'absorbance

Dans les 2 heures, mesurer l'absorbance à 450 nm en utilisant un lecteur de plaque. On recommande d'utiliser une lecture à 650 nm comme référence.

CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosages pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

RESULTATS

Calcul des résultats

Calculer la moyenne des absorbances des doublets. Construire une courbe d'étalonnage en log-linéaire, en reportant la moyenne des absorbances des six standards en ordonnée et les concentrations respectives de CrossLaps en abscisse. Tracer la courbe
Déterminer la concentration en CrossLaps pour le contrôle et les échantillons par interpolation de la courbe.

Exemple de résultats :

Standards/ Contrôles / Échantillons	Concentration CrossLaps (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Moyenne A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolated CrossLaps Conc. (µg/L)
Standard 0	0	1.950 / 2.027	1.989	
Standard 1	75	1.599 / 1.705	1.652	
Standard 2	250	1.236 / 1.275	1.256	
Standard 3	750	0.785 / 0.850	0.818	
Standard 4	2250	0.472 / 0.496	0.484	
Standard 5	6750	0.267 / 0.285	0.276	
Control 1		0.648 / 0.671	0.657	1193
Control 2		0.440 / 0.468	0.454	2462
Sample I		1.161 / 1.202	1.182	305
Sample II		0.729 / 0.765	0.747	919
Sample III		0.423 / 0.422	0.423	2829

Note : Ces données sont utilisées à titre d'exemple et ne doivent en aucun cas être substituées aux résultats obtenus dans le laboratoire.

Calcul des valeurs corrigées de CrossLaps

Pour chaque échantillon, la concentration de CrossLaps (µg/L) et la concentration en créatinine (mM= mmol/l) doivent être déterminées. Pour la détermination de la créatinine, la méthode de Jaffe (3) ou une méthode équivalente est conseillée.

L'équation suivante corrige la concentration de CrossLaps en fonction de la clairance urinaire:

$$\text{Valeur corrigée de CrossLaps (µg/mmol)} = \frac{\text{CrossLaps (µg/L)}}{\text{Créatinine (mM)}}$$

Performance du dosage

Les données de performances ont été établies en utilisant des échantillons urinaires provenant de secondes mictions matinales.

Limite de détection: 50 µg/L

Cette valeur correspond à 2 fois la déviation standard de la moyenne de 21 déterminations du blanc (Standard 0 CrossLaps).

Precision

Les résultats suivants ont été obtenus en testant 5 fois 4 échantillons différents et cela 5 jours de suite (25 déterminations pour chaque échantillon).

Variations inter-essais (n=25)

Moyenne (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	13.68	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

Variations intra-essais (n=25)

Moyenne (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

Dilution/Linéarité

Le kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA est linéaire dans l'intervalle de 50 µg/l à 6750 µg/l de CrossLaps. Des échantillons urinaires de concentration variant de 3450 à 4340 µg/l de CrossLaps ont été dilués dans du standard 0 et dosés dans le kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA. L'échantillon urinaire initial est la valeur de référence 100%.

Échantillon	Dilution	Val Cible µg/L	Mesurée µg/L	Corrigée µg/L	Récupération %
1	neat	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	neat	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	neat	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
Moyenne					101

Récupération

Les échantillons "chargés" ont été préparés en ajoutant des quantités variables d'antigène CrossLaps à 3 échantillons urinaires différents.

Échantillon	Initial µg/L	Ajouté µg/L	Attendu µg/L	Mesuré µg/L	Récup %
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
Moyenne					96

Valeurs attendues

Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme de valeurs normales et pathologiques.

A titre d'exemple, des valeurs pour diverses populations sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Toutes ces valeurs ont été obtenues avec des échantillons de la seconde miction matinale.

Pour plus de détails, se référer aux références bibliographiques.

Populations	Nombre de sujets	Valeurs moyennes Urine CrossLaps ($\mu\text{g}/\text{mmoL Cr}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmoL Cr}$)
Femmes pré-ménopause	175	191	67 – 544
Femmes post-ménopause	250	324	121 – 874
Hommes	249	174	54 – 559

Variations circadiennes individuelles :

Les variations circadiennes individuelles ont été évaluées en testant les urines (seconde miction matinale) de 14 femmes ménopausées. Les prélèvements ont été réalisés le matin à jeun en 5 fois sur 2 semaines.

Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA ($\mu\text{g}/\text{mmol}$ créatinine)								
No patiente	Age	visite 1	visite 2	visite 3	visite 4	visite 5	moyenne	Dev. standard
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
moyenne	68							16
SD	7.80							10.87

EINLEITUNG

Verwendungszweck

Der Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA ist ein enzymatimmunologischer Test zur Quantifizierung von Abbauprodukten C-terminaler Telopeptide des Typ-I Kollagens in menschlichem Urin. **Der Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA Test wird vorgesehen für *in vitro* Diagnostik zur Indikation von humenem Knochenresorption und kann verwendet werden als Unterstützung bei:**

A. Monitorieren der veränderten Knochenresorption bei:

1. Anti-resorptive Therapien bei postmenopausalen Frauen:
 - a. Hormonersatztherapie (HRT) mit Hormonen und Pharmaka mit hormonartiger Wirkung
 - b. Biphosphonattherapie
2. Anti-resorptive Therapien in Individuen mit diagnostizierter Osteopenie:
 - a. Hormonersatztherapie (HRT) mit Hormonen und Pharmaka mit hormonartiger Wirkung
 - b. Biphosphonattherapie

B. Prognose der Knochen-Mineraldichte bei postmenopausalen Frauen unter anti-resorptiver Therapie

- a. Hormonersatztherapie (HRT) mit Hormonen und Pharmaka mit hormonartiger Wirkung
- b. Bisphosphonattherapie

Einschränkungen

Der Gebrauch des Testes ist nicht etabliert worden, um die Entwicklung einer Osteoporose oder das zukünftige Frakturrisiko vorherzusagen. Der Gebrauch des Tests ist nicht etabliert bei Hyperparathyroidismus oder Hyperthyroidismus. Wenn der Test zur Therapieüberwachung eingesetzt wird, können die Ergebnisse falsch interpretiert werden bei Patienten mit klinischen Syndromen, die die Knochenresorption beeinflussen (wie bei Knochenmetastasen, Hyperparathyroidismus oder Hyperthyroidismus).

Ergebnisse des Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA sollten im Zusammenhang mit klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden, und sollten nicht allein zur Beginn oder Veränderung einer Therapie benutzt werden.

Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA -Werte nicht mit Serum CrossLaps® (CTX-I) EIA -Werten verwechseln!

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das Typ I-Collagen macht mehr als 90 % der organischen Matrix des Knochens aus und wird vorwiegend im Knochen synthetisiert (1). Während der Erneuerung des Skeletts wird das Typ I-Collagen abgebaut und kleine Peptidfragmente gelangen in den Urin. Diese Fragmente können mit dem Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA wie beschrieben gemessen werden (2). Der Sandwich Test ist wie berichtet als geeignet zur Follow-up von anti-resorptiven Behandlung bei Patienten mit metabolischen Knochenkrankungen geeignet (2-16).

Testprinzip

Der Urine CrossLaps® EIA basiert auf einer kompetitiven Bindung der anti-CrossLaps Antikörpern an entweder löslichen CrossLaps Antigenen oder an CrossLaps-Antigen beschichteten Mikrotiter Platten.

Standard, Kontrollen und Unbekannte Proben werden in die entsprechende Microtiterwells pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der anti-CrossLaps Antikörper und eine Inkubation von 1 Stunden bei 18-22°C findet statt. Die Wells werden gewaschen und peroxidase-konjugierte Anti-kaninchen Immunglobuline wird zugegeben. Die Wells werden anschliessend wieder für 1 Stunden bei 18-22°C inkubiert. Nach einem zweiten Waschschrift werden die Wells für 15 Minuten mit einem chromogenen Substrat inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt und die Absorption gemessen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Folgende Vorsichtsmassnahmen sollten im Labor eingehalten werden:

- Beim Gebrauch von immunodiagnostischen Materialien sollte nicht gegessen, getrunken, geraucht oder Kosmetik benutzt werden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Verwendung immundiagnostischer Materialien sollten Handschuhe getragen werden. Hände anschliessend gründlich waschen.
- Die Arbeitsfläche sollte mit absorbierendem Papier abgedeckt werden.

Warnungen

Nur für *in-vitro*-Anwendung.

- Alle Reagenzien und Ausrüstungen sollten wie infektiöses Material behandelt und entsorgt werden.
- Die Bestandteile des Kits sollten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden und Reagenzien verschiedener Chargen sollten nicht gemischt werden.

Aufbewahrung

Das Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA Kit wird nach Gebrauch bei 2-8°C gelagert. Bei diesen Bedingungen ist der Kit stabil bis zum auf der Packungen angegebenen Haltbarkeitsdatum.

MATERIAL

Probengewinnung

Die Menge der Peptide gemessen mit dem Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA im Urin wird nicht beeinflusst von Nahrungseinnahme, für die Einheitlichkeit wird jedoch empfohlen, den zweiten Morgenurin zu verwenden. Zum Monitorieren einzelner Patienten, sollten die follow-up Proben unter identischen Bedingungen wie die Erstentnahmen gewonnen werden (d.h. zweiter Morgenurin).

Bitte beachten, dass es empfohlen wird für optimale Ergebnisse die Proben zu zentrifugieren (z.B. 2000g; 10 Min.). Die Urinproben sollten im Kühlschrank (2-8°C) für weniger als eine Woche aufbewahrt oder zur längeren Aufbewahrung eingefroren (<-18°C) werden. Proben offensichtlich mit Vollblut kontaminiert könnten mit dem Test interferieren. Diese Proben sollten verworfen werden und eine neue Probe entnommen werden.

Beigefügtes Material

Ehe der Kit geöffnet wird, bitte den Abschnitt Vorsichtsmassnahmen lesen. Der Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Bestimmungen.

Mikrotiterplatten MICROPLAT

Mikrotiterstreifen (12 x 8 Vertiefungen), mit CrossLaps-Antigen vorbeschichtet, geliefert in einem Kunststoffrahmen.

CrossLaps Standard CAL 0

Ein Fläschchen (min. 11.0 mL/Fläschchen) gebrauchsfertiger PBS-gepufferte Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel.

CrossLaps Standard CAL 1 - 5

Fünf Fläschchen (min. 0.4mL/Fläschchen) gebrauchsfertige CrossLaps Standards in PBS-gepufferte Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel. Der genaue Wert für jeden Standard ist auf dem Qualitätskontrollbericht aufgedruckt.

Urin Kontrolle CTRL 1 - 2

Zwei Fläschchen (min. 0.4mL/Fläschchen) gebrauchsfertiges humanes Urin in Pufferlösung mit Proteinstabilisatoren, Detergenzien und Konservierungsmittel.

Primäre Antikörperlösung AB

Ein Fläschchen (min. 12.0 mL) gebrauchsfertige Kaninchen anti-CrossLaps Antikörper. Zubereitet in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergenzien und Konservierungsmittel.

Peroxidase-konjugierte Antikörper [ENZYMCON]

Ein Fläschchen (min. 12.0 mL) gebrauchsfertiger peroxidase-konjugierte anti-Kaninchen Antikörper in gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergenzien und Konservierungsmittel.

Substratlösung [SUBS TMB]

Ein Fläschchen (min. 12 mL) gebrauchsfertiger Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat in einem sauren Puffer. Das chromogene Substrat kann leicht bläulich erscheinen.

Stopplösung [H₂SO₄]

Ein Fläschchen (min. 12 mL) gebrauchsfertige 0.18 mol/L Schwefelsäure.

Waschpuffer [WASHBUF 50x]

Ein Fläschchen (min. 20 mL) eines konzentrierten Waschpuffers mit Detergentien und Konservierungsmittel. Vor Gebrauch 1+50 verdünnen.

Klebestreifen

Adhesiver Film um die Wells während Inkubation zu bedecken.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Behälter zur Vorbereitung der Antikörperlösung und der Waschlösung
- Präzisionsmikropipetten für 15 µL
- Destilliertes Wasser
- Präzisionsmultikanalpipette für 100 µL
- Mikrotiterplatten-Schüttler (300 rpm)
- Mikrotiterplattenreader

TESTDURCHFÜHRUNG

Für die optimale Durchführung des Tests ist es wichtig die Instruktionen wie folgt zu befolgen. Vor dem Gebrauch alle Lösungen vorbereiten und bei 18-22°C equilibrieren lassen. **Test bei 18-22°C durchführen.**

Testdurchführung

Die Anzahl der benötigten Immunostrips für den Test ermitteln. Es wird empfohlen alle Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen. Zusätzlich werden für jede Durchführung 16 Wells für die Standards und Kontrolle benötigt. Die Anzahl der benötigten Immunostrips in den Plastikrahmen plazieren. Unbenutzte Strips in die dicht verschlossene Folienbeutel mit Trockenkapseln aufbewahren.

1 Pipettieren von Standards oder Proben

15 µL von entweder **Standard** [CAL 0-5], **Kontrolle** [CTRL 1-2] oder unbekannte Kontrolle in die entsprechenden Wells pipettieren.

2 Inkubation in Immunostreifen

100 µL **primäre Antikörperlösung** [Ab] in jedes Well. Die Immunostrips mit Klebestreifen bedecken und für 60±5 Minuten bei 18-22°C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (300 rpm) inkubieren.

3 Waschen

Die Immunostrips 5 mal manuell mit 300 µL **Waschpuffer**, [WASHBUF 50x] 1+50 verdünnt in destilliertem Wasser, waschen. Bei Gebrauch von einem automatischen Plattenwäscher die Instruktionen des Herstellers oder den Richtlinien des Labors folgen. Gewöhnlich sind 5 Waschschritte ausreichend. Nach jedem manuellen oder automatischen Waschschrift sicherstellen, dass die Wells vollständig geleert sind nach jedem manuellen oder automatischen Waschschrift.

4 Inkubation mit peroxidase-konjugiertem Antikörper

100 µL **peroxidase-konjugiertem Antikörper** [ENZYMCON] in jedes Well pipettieren, mit Klebestreifen bedecken und inkubieren für 60±5 Minuten bei 18-22°C auf einem Mikrotiterplatten- Schüttler (300 rpm) inkubieren.

5 Waschen

Waschen wie beschrieben in Schritt 3.

6 Inkubation mit der chromogenen Lösung

100 µL der **Substratlösung** [SUBS TMB] in jedes Well pipettieren, mit Klebestreifen bedecken und für 15±2 Minuten bei 18-22°C im Dunklen auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler (300 rpm) inkubieren.

Nicht direkt von dem Fläschchen mit dem TMB Substrat pipettieren, sondern überführe das benötigte Volumen in einem sauberen Behältnis. Übriggebliebenes Substrat in dem Behältnis sollte verworfen und nicht in Fläschchen zurückgeschüttet werden.

7 Stoppen der Farbreaktion

100 µL der **Stopplösung** [H₂SO₄] in jedes Well pipettieren.

8 Absorption messen

Absorption bei 450 nm mit 650 nm als refrenz innerhalb zwei Stunden messen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Gute Labor Praxis (Good Laboratory Practice – GLP) verlangt den Gebrauch von Qualitätskontrollen, die bei jedem Testansatz mitgemessen werden, um die Durchführung des Test zu überprüfen. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt werden. Die Ergebnisse mit den appropriate statistischen Methoden analysieren.

ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Berechne den Mittelwert der Dublikate der Absorptionsbestimmung. Erstelle eine Standardkurve auf log-linearem Papier durch das Auftragen der durchschnittlichen Absorptionen der sechs Standards (ordinate) gegen die entsprechende CrossLaps-Konzentration (Abzisse). Zeichne die am besten passende Kurve. Alternativ kann eine 4-Parameter-Funktion verwendet werden. Ermittelt wird die CrossLaps-Konzentration der Kontrolle und jeder Patientenprobe durch Interpolation.

Beispiel von ermittelten Resultaten:

Standards / Kontrolle / Proben	CrossLaps konz. (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Mittelwert A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolierte CrossLaps konz. (µg/L)
Standard 0	0	1.950 / 2.027	1.989	
Standard 1	75	1.599 / 1.705	1.652	
Standard 2	250	1.236 / 1.275	1.256	
Standard 3	750	0.785 / 0.850	0.818	
Standard 4	2250	0.472 / 0.496	0.484	
Standard 5	6750	0.267 / 0.285	0.276	
Control 1		0.643 / 0.671	0.657	1193
Control 2		0.440 / 0.468	0.454	2462
Sample I		1.161 / 1.202	1.182	305
Sample II		0.729 / 0.765	0.747	919
Sample III		0.423 / 0.422	0.423	2829

Bitte beachten: Die oben aufgeführten Daten dienen nur der Illustration und sollten nicht zur Auswertung des Assays verwendet werden.

Berechnung der korrigierten CrossLaps Werte

Für jede Probe wollte die CrossLaps-Konzentration und die Kreatinin-Konzentration ermittelt werden. Für die Bestimmung von Kreatinin wird die Methode von Jaffe oder gleichwertiges empfohlen.

Die folgende Gleichung korrigiert die CrossLaps-Konzentration für Variationen der Urinkonzentration:

$$\text{Korr. CrossLaps-Wert } (\mu\text{g}/\text{mmol}) = \frac{\text{CrossLaps } (\mu\text{g}/\text{L})}{\text{Kreatinin (mM)}}$$

Testcharakteristika

Alle Daten sind etabliert worden beim Gebrauch von zweiten Morgenurin wenn nicht anders beschrieben.

Nachweisgrenze: 50 µg/L

Dies entspricht der Konzentration von zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert von 21 Bestimmungen von „CrossLaps Standard 0“.

Präzision

Die folgenden Ergebnisse wurden ermittelt durch fünf Assaydurchführungen von vier Proben jeden Tag in fünf aufeinanderfolgenden Tagen (insgesamt 25 Bestimmungen von jeder Probe).

Inter-Assay Variation (n=25)

Mittelwert (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	13.68	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

Intra-Assay Variation (n=25)

Mittelwert (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

Verdünnung/Linearität

Der Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA ist linear im Bereich von 50 µg/L bis 6750 µg/L CrossLaps.

Urinproben mit einer Konzentration von 3450-4340 µg/L CrossLaps werden mit Standard 0 verdünnt und die Konzentration von CrossLaps werden mit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA bestimmt. Die Urin-Ursprungsprobe wird als 100% gesetzt.

Probe	Verdünnung	Erwartet µg/L	Gemessen µg/L	Korrigiert µg/L	Wiederfindung %
1	neat	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	neat	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	neat	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
Durchschnitt					101

Wiederfindung

Gespikte Proben werden hergestellt durch die Zugabe von unterschiedlichen Mengen des CrossLaps-Antigen zu drei verschiedenen Urinproben.

Probe	Initial µg/L	Zugegeben µg/L	Erwartet µg/L	Gemessen µg/L	Wiederfindung %
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
Mittelwert					96

Erwartete Werte

Es ist empfehlenswert, für ein Labor seine eigenen Normwert- und pathologischen Bereiche zu etablieren. Als Beispiel werden die Durchschnittswerte und Standardabweichungen für verschiedene Populationen unten angegeben. Alle Werte sind etabliert worden bei gebrauch von zweitem Morgenurin. Für weitere Daten wird auf die Literaturliste hingewiesen.

Populations	Anzahl	Mittelwert Urine CrossLaps (µg/mmol Kreatinin)	95% Confidence Interval (µg/mmolL Kreatinin)
Prämenopausale Frauen	175	191	67 – 544
Postmenopausale Frauen	250	324	121 – 874
Männer	249	174	54 – 559

Tag-zu-Tag individuelle Variation

Die Tag-zu-Tag intraindividuelle Variation wurde ermittelt durch die Analyse von Urinproben (zweiter Morgenurin) von 14 gesunde postmenopausalen Frauen zu fünf Zeitpunkten über 2 Wochen.

Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA [µg/mmol Kreatinin]								
Frau nr.	Age	Besuch 1	Besuch 2	Besuch 3	Besuch 4	Besuch 5	Mittelwert	Standard Abw.
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
Mittelwert	68							16
SD	7.80							10.87

INTRODUZIONE

Uso del kit

Il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa dei prodotti di degradazione del telopeptide C-terminale del collagene umano di tipo I nelle urine. Il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA è per uso diagnostico in vitro come marcatore di riassorbimento osseo e può essere usato per:

A. Monitorare le modificazioni del riassorbimento osseo delle:

- 1) Terapie per la prevenzione del riassorbimento osseo in donne in postmenopausa:
 - a) Terapie ormonali sostitutive (HRT) con ormoni o sostanze ad azione ormonale.
 - b) Terapie con difosfonati.
- 2) Terapie anti riassorbimento osseo in soggetti con diagnosi di osteopenia;
 - a) Terapie ormonali sostitutive (HRT) con ormoni o sostanze ad azione ormonale.
 - b) Terapie con difosfonati.

B. Previsione della risposta scheletrica valutata con la densitometria ossea in donne in postmenopausa in terapia con farmaci che agiscono sul riassorbimento osseo

- a) Terapie ormonali sostitutive (HRT) con ormoni o sostanze ad azione ormonale.
- b) Terapie con difosfonati.

Limiti del metodo

L'uso di questo dosaggio non è stato validato per predire lo sviluppo di osteoporosi o di rischi futuri di fratture.

L'uso di questo dosaggio non è stato validato nell'iperparatiroidismo o nell'ipertiroidismo. Usando il kit per monitorare la terapia si possono ottenere risultati non corretti in pazienti con condizioni cliniche note per il loro effetto sul riassorbimento osseo quali metastasi ossee, iperparatiroidismo o ipertiroidismo. I risultati ottenuti con il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA devono essere interpretati insieme ai riscontri clinici e ai risultati di altri test diagnostici e non devono essere usati da soli per iniziare o modificare una terapia.

I valori ottenuti con il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA non possono essere interpolati con i valori ottenuti con il kit Serum CrossLaps® (CTX-I) EIA.

Descrizione del metodo

Il collagene di tipo I costituisce più del 90% della matrice organica dell'osso dove è prevalentemente sintetizzato. (1). Durante il rimaneggiamento scheletrico, viene degradato il collagene di tipo I e vengono escreti nelle urine piccoli frammenti peptidici. Questi frammenti possono essere dosati con il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA. Questo metodo si è dimostrato utile nel monitoraggio degli effetti della terapia anti riassorbimento osseo in pazienti con malattie metaboliche dell'osso (2-16).

Principio del metodo

Il metodo è basato sul legame competitivo per i siti di legame di anticorpi anti CrossLaps, di antigeni CrossLaps in soluzione e antigeni CrossLaps adsorbiti sulla superficie interna di pozzetti di una micropiastra.

Standard, controlli e campioni vengono pipettati in pozzetti di una micropiastra in cui adsorbiti antigeni CrossLaps. È legata streptavidina. Viene quindi aggiunta una soluzione contenente anticorpi anti CrossLaps. Dopo un'ora di incubazione a 18-22°C, si lava la micropiastra e si aggiungono anti immunoglobuline di coniglio legate a perossidasi di rafano. Dopo un'ora di incubazione a 18-22°C, si lava la micropiastra e si aggiunge il substrato; dopo 15 minuti si blocca la reazione con acido solforico e si misura l'assorbanza dei pozzetti.

PRECAUZIONI

In laboratorio devono essere sempre osservate le seguenti precauzioni:

- Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici durante la manipolazione di reattivi immunodiagnostici.
- Non usare pipette a bocca.
- Quando si manipolano reattivi immunodiagnostici indossare sempre guanti protettivi; terminato il lavoro lavarsi accuratamente le mani con acqua e sapone.
- Coprire l'area di lavoro con fogli di carta assorbente.

Attenzione

Solo per uso *in vitro*.

- I reattivi e il materiale di laboratorio deve essere manipolato ed eventualmente eliminato come se fosse potenzialmente infettivo.
- Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza e non utilizzare insieme reattivi di lotti diversi.

Conservazione dei reattivi

Il kit Urine CrossLaps® EIA deve essere conservato a 2-8°C. In queste condizioni è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

MATERIALI

Raccolta dei campioni

Le concentrazioni dei frammenti peptidici nelle urine misurate con il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA non variano con la dieta; per una migliore riproducibilità si consiglia di raccogliere le seconde urine del mattino e, in caso di dosaggi ripetuti nel tempo, di raccogliere le urine sempre nello stesso modo. Per ottenere risultati ottimali è necessario centrifugare i campioni a 2000g per 10 minuti. Le urine sono stabili fino ad una settimana a 2-8°C e a < -18°C per periodi più lunghi. Scartare i campioni contenenti tracce di sangue perché questo può interferire nel dosaggio. Raccogliere quindi un nuovo campione di urine.

Reattivi forniti

Prima di utilizzare il kit, leggere la sezione Precauzioni di questo manuale. Il kit contiene reattivi sufficienti per 96 determinazioni.

Micropiastra MICROPLAT

Strisce di micropozzetti (12 x 8 pozzetti) pre-rivestiti con CrossLaps, fornite in un telaio di plastica.

Standard CAL 0 **1 flacone da 11 mL**

Tampone PBS pronto per l'uso, contenente uno stabilizzante delle proteine e conservanti.

Standard CAL 1-5 **5 flaconi da 0.4mL**

Standard a 5 livelli di in tampone PBS pronto per l'uso, contenente uno stabilizzante delle proteine e conservanti. Il valore esatto di ciascuno standard è stampato sull rapporto del controllo di qualità.

Urine di Controllo CTRL 1-2

2 flacone da 0.4mL Urine umane pronte per l'uso in tampone PBS, contenente uno stabilizzante delle proteine e conservanti.

Il valore esatto di ciascuno controllo è stampato sull rapporto del controllo di qualità.

Soluzione dell'anticorpo primario Ab **1 flacone da 12.0 mL**

Anticorpi policlonali anti CrossLaps da coniglio, pronti per l'uso, in tampone contenente uno stabilizzante delle proteine, detergenti e conservanti.

Anticorpo coniugato con perossidasi ENZYMCNJ **1 flacone da 12.0 mL**

Anticorpo anti immunoglobuline di coniglio, in tampone contenente uno stabilizzante delle proteine, detergenti e conservanti.

Substrato SUBS TMB **1 flacone da 12.0 mL**

Soluzione pronta per l'uso di trimetilbenzidina (TMB) in tampone acido. Il cromogeno è presenta una leggera colorazione blu.

Soluzione di stop H₂SO₄ **1 flacone da 12.0 mL**

Soluzione pronta per l'uso di Acido solforico 0.18 M.

Tampone di lavaggio WASHBUF 50x **1 flacone da 20.0 mL**

Tampone di lavaggio concentrato, contenente detergenti e conservanti. Diluire 1+50 prima dell'uso.

Copripietra adesivo

Materiale richiesto ma non fornito

- Vetreria per preparare la soluzione di lavoro dell'anticorpo e la soluzione di lavaggio.
- Micropipette di precisione per 15 µL.
- Acqua distillata.
- Multipipette di precisione a 8 canali per 100 µL.
- Agitatore rotante per micropiastre (300).
- Lettore di micropiastre.

METODO DEL DOSAGGIO

Pr ottenere risultati ottimali è importante seguire attentamente le istruzioni sotto riportate. Prima dell'uso preparare ed equilibrare tutte le soluzioni a temperatura ambiente (18-22°C). Eseguire il dosaggio a temperatura ambiente (18-22°C). Determinare il numero di strip necessarie per il dosaggio. Eseguire il dosaggio in duplicato; per la curva standard e il controllo sono necessari 14 pozzetti. Inserire le strip nel telaio fornito; conservare le strip avanzate nella loro busta di plastica con il dissecante. Controllare che la busta sia chiusa perfettamente.

1 Pipettare Standard e Campioni:

Pipettare nei rispettivi pozzetti 15 µL di Standard CAL 6-5, controllo CTRL 1-2 e campioni.

2 Incubazione

Aggiungere 100 µL di anticorpo primario AB in tutti i pozzetti. Coprire con il copripietra adesivo e incubare 60±5 minuti a temperatura ambiente (18-22°C) su un agitatore rotante per micropiastre (300 rpm).

3 Lavaggio

Lavare 5 volte le strisce con 300 µL tampone di lavaggio diluito (WASHBUF 50x 1+50 con acqua distillata). Se si usa un lavatore automatico, seguire le istruzioni del produttore. Di solito 5 cicli di lavaggio sono sufficienti. Verificare che tra un ciclo e l'altro di lavaggio i pozzetti vengano aspirati completamente.

4 Incubazione con il coniugato

Aggiungere 100 µL di anticorpo coniugato con perossidasi di rafano ENZYMCON in tutti i pozzetti. Coprire con il copripietra adesivo e incubare 60±5 minuti a temperatura ambiente (18-22°C) su un agitatore rotante per micropiastre (300 rpm).

5 Lavaggio

Procedere come descritto al punto 3.

6 Incubazione con il substrato

Pipettare 100 µL di soluzione di substrato SUBS TMB in tutti i pozzetti e incubare 15±2 minuti a

temperatura ambiente (18-22°C) al buio su agitatore rotante (300 rpm). Coprire con un copripietra adesivo. Per evitare contaminazioni del substrato, trasferire la quantità necessaria di substrato in un contenitore pulito. Dopo l'uso scartare la soluzione avanzata nel contenitore.

7 Arresto della reazione

Pipettare 100 µL di soluzione di stop H₂SO₄ in tutti i pozzetti.

8 Misura dell'assorbanza

Misurare l'assorbanza a 450 nm contro 650 nm entro due ore.

CONTROLLO DI QUALITA'

La "Good Laboratory Practice" (GLP) richiede che vengano inseriti in ogni esperimento sieri di controllo per verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come i campioni e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

RISULTATI

Calcolo dei risultati

Calcolare la media delle assorbanze dei duplicati e costruire una curva standard su carta millimetrata log-lineare, ponendo in ordinata la media delle assorbanze dei 6 standard e in ascissa le concentrazioni di CrossLaps corrispondenti. Determinare per interpolazione la concentrazione di CrossLaps in campioni e controlli. In alternativa è possibile utilizzare un'interpolazione computerizzata a 4 parametri.

Esempio dei risultati che si ottengono in un dosaggio:

Standards / Controllo / Campioni	Conc. di CrossLaps (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Media A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Conc. interpolata di CrossLaps (µg/L)
Standard 0	0	1.950 / 2.027	1.989	
Standard 1	75	1.599 / 1.705	1.652	
Standard 2	250	1.236 / 1.275	1.256	
Standard 3	750	0.785 / 0.850	0.818	
Standard 4	2250	0.472 / 0.496	0.484	
Standard 5	6750	0.267 / 0.285	0.276	
Control 1		0.643 / 0.671	0.657	1193
Control 2		0.440 / 0.468	0.454	2462
Campione I		1.161 / 1.202	1.182	305
Campione II		0.729 / 0.765	0.747	919
Campione III		0.423 / 0.422	0.423	2829

Nota: I dati sopra riportati sono solo esemplificativi e non devono essere utilizzati per calcolare i risultati dei singoli dosaggi.

Calcolo dei valori di CrossLaps corretti per la concentrazione di creatinina.

Determinare per ogni campione la concentrazione di CrossLaps (µg/L) e di creatinina (mmol/L). Per la determinazione della creatinina usare il metodo secondo Jaffe (3) o un metodo equivalente.

L'equazione seguente serve per esprimere in µg/mmol di creatinina i valori di CrossLaps letti sulla curva, come fattore di correzione per la possibile diversa osmolarità delle urine.

$$\text{Valore di CrossLaps per } \mu\text{g/mmol creatinina} = \frac{\text{CrossLaps } (\mu\text{g/L})}{\text{Creatinina (mmol/L)}}$$

Caratteristiche del metodo

Tutte i dati sotto riportati sono stati ottenuti dosando, tranne nei casi indicati, le seconde urine del mattino.

Concentrazione minima rilevabile: 50 µg/L di CrossLaps

La concentrazione minima rilevabile è la concentrazione di CrossLaps corrispondente a due DS oltre la media delle assorbanze di 21 determinazioni dello standard zero ("CrossLaps Standard 0").

Imprecisione

I risultati riportati nella tabella seguente si riferiscono a 5 replicati di quattro campioni al giorno raccolti in

5 giorni consecutivi (25 determinazioni in totale per ciascun campione).

Variazione intrasaggio (n=25)

Media (µg/L)	DS (µg/L)	CV (%)
240	13.68	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

Variazione inter saggio (n=25)

Media (µg/L)	DS (µg/L)	CV (%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

Diluizione/Linearità

Il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA è lineare nell'intervallo compreso tra 50 µg/L e 6750 µg/L di CrossLaps. Campioni di urine con concentrazioni di CrossLaps comprese tra 3450 e 6750 µg/L sono stati diluiti con lo standard zero (standard 0) e la loro concentrazione di CrossLaps è stata determinata con il kit Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA. Il urine non diluito non diluito è riportato come 100%.

Campione	Diluizione	Valore atteso µg/L	Valore misurato µg/L	Valore corretto µg/L	Recupero %
1	neat	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	neat	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	neat	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
Media					101

Wiederfindung

Gespikete Proben werden hergestellt durch die Zugabe von unterschiedlichen Mengen des CrossLaps-Antigen zu drei verschiedenen Urinproben.

Campione	Valore iniziale µg/L	Concentrazione aggiunta µg/L	Valore atteso µg/L	Valore misurato µg/L	Recupero %
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
Medio					96

Valori attesi

Ogni laboratorio deve stabilire propri intervalli di riferimento per soggetti normali e patologici. I valori riportati nella seguente tabella sono stati determinati con una sperimentazione indipendente e vengono

forniti a titolo di esempio. Per approfondimenti si rimanda alla bibliografia.

Popolazione	Numero di soggetti	Valore medio Urin CrossLaps ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)	95% Confidence Interval ($\mu\text{g}/\text{mmol Cr}$)
Donne in premenopausa	175	191	67 – 544
Donne in postmenopausa	250	324	121 – 874
Uomini	249	174	54 – 559

Variatione giornaliera individuale:

E' stata valutata la variazione giornaliera individuale dosando campioni delle seconde urine del mattino da 14 donne in post menopausa apparentemente sane raccolti in 5 giorni diversi durante 2 settimane.

Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA [$\mu\text{g}/\text{mmol Creatinina}$]								
Soggetto	Eta	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Media	DS
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
Mediat D	68 7.80							16 10.87

INTRODUCCION

Intended use

El Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA es un test Inmuno enzimático para la cuantificación de la degradación de los telopéptidos C-Terminal del colágeno Tipo I en orina.

El Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA es para diagnóstico *in vitro*. Se utiliza para cuantificar los cambios de resorción ósea en los siguientes casos:

A. Monitorización de los cambios de resorción ósea en

1. Terapias Anti- resortivas en mujeres postmenopáusicas
 - a. En tratamientos con terapias hormonales sustitutorias HRT
 - b. Terapias con Bifosfonatos
2. Terapias Anti-resortivas en pacientes con Osteopenia.
 - a. Hormone Replacement Therapies (HRT) with hormones and hormone like drugs.
 - b. Terapias con Bifosfonatos

B. Cambios en la Densidad Osea en mujeres Post menopáusicas con terapias Anti resortivas

- a. Terapias hormonales sustitutorias
- b. Terapias con Bifosfonatos.

Limitaciones

El empleo del Test no ha sido establecido para predecir el desarrollo de Osteoporosis o riesgo de fracturas. Tampoco en caso de hiperparatoidismo o hipertiroidismo.

Los resultados obtenidos con el Test Urine CrossLaps deberán interpretarse en el contexto clínico del paciente, de manera que pacientes con metástasis, hiperparatoidismo o hipertiroidismo pueden interferir en los resultados del Test.

Los valores del Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA no son intercambiables con los valores obtenidos con los del Test Serum CrossLaps® (CTX-I) EIA.

Resúmen y Explicación del Test

An El colágeno Tipo I representa el 90% de la matriz ósea. Es sintetizado en primer lugar en el hueso. Durante la renovación del esqueleto, el colágeno Tipo I es degradado en pequeños fragmentos y excretados a la orina. Estos fragmentos pueden ser medidos mediante el Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA, siendo extraordinariamente útil para la monitorización del tratamiento con terapias anti resortivas de los pacientes con enfermedades óseas.

Principio del procedimiento

El ensayo Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA está basado en la union competitiva enter el Anticuerpo Anti CrossLaps y el CrossLaps soluble o CrossLaps fijado a la Microplaca.

Los estándares, controles y muestras desconocidas son depositadas en la microplaca. El anticuerpo anti-Crosslaps son añadidos y incubados durante una hora a 18-22°C. Las pocillos se lavan y se añade el anticuerpo anti.inmunoglobina de conejo conjugado con Peroxidasa. Se procede a la incubación durante 1 hora a 18-22°C. Se procede a un segundo lavado, se procede a la incubación con el sustrato cromogénico durante 15 minutos.

Se para la reacción y se mide la absorbancia.

PRECAUCIONES

- No comer, no beber, no fumar ni aplicar cosméticos donde los materiales inmunoenzimáticos son manipulados
- No pipetear con la boca
- Utilizar guantes para la manipulación, y lavar las manos después
- Cubrir la zona de trabajo, con papel absorbente

Advertencia

Para uso *In vitro*

- Los materiales o reactivos, procedentes de muestras infecciosas, serán eliminados
- No utilizar Kit caducados
- No mezclar reactivos de lotes diferentes

Storage

Store the Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA kit upon receipt at 2-8°C under these conditions the kit is stable until the expiry date stated on the box.

MATERIALES

Recogida de la muestra

Los niveles de medida del péptido por el Test Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA, no varía con la dieta, sin embargo se recomienda para la consistencia de los resultados utilizar la segunda orina de la mañana. Las muestras deberán recogerse en las mismas condiciones, para evitar variaciones.

Para optimizar los resultados, es recomendable centrifugar la muestra (ej. 2000g, 10 minutos).

Mantener la muestra de orina refrigerada (2-8°C) para almacenamientos inferiores a 1 semana. Para periodos de tiempo mayores, se recomienda congelar la muestra a -18°C.

Las muestras contaminadas con sangre pueden interferir el ensayo. Deberán desecharse y recoger nuevas muestras.

Materiales contenidos en el Kit

Antes de abrir el Kit, leer la sección de precauciones. Cada Kit contiene 96 determinaciones.

Immunotiras MICROPLAT

Tiras de micropocillos (12 x 8 pocillos) recubiertos en las que está fijado el Antígeno CrossLaps, suministrados en un marco de plástico.

Crosslaps Estándar CAL 0

Un vial (min 11.0 mL) con solución Buffer PBS listo para usar, con proteína estabilizada y conservante.

Estándar Crosslaps CAL 1-5

Cinco viales (min 0.4mL/vial) de solución estándar CrossLaps en solución Buffer listo para usar, con proteína estabilizada y conservante. El valor exacto de cada estándar está indicado en el informe de control de calidad.

Control de Orina CTRL 1-2

Duo vial (min. 0.4mL/vial) listo para usar de orina en solución Buffer con proteína estabilizada detergente y conservante.

Solución Anticuerpo Primario AB

Un vial (min. 12.0 mL) listo para usar, de Anticuerpo anti.CrossLaps obtenido de conejo. Preparado en solución Buffer con proteína estabilizada, detergente y conservante.

Anticuerpo conjugado de la peroxidasa ENZYMCNJ

Un vial (min. 12.0 mL) que contiene el Anticuerpo Anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano, en una solución tampon conteniendo detergente, conservante y un estabilizante de proteína. Listo para usar.

Solución sustrato SUBS TMB

Un vial (min. 12.0 mL) listo para usar de TMB (tetrametil bencidina) sustrato en un ácido buffer. La solución sustrato debe aparecer ligeramente azul.

Solución de Parada H₂SO₄

Un vial (min. 12.0 mL) listo para usar de 0,18mol/L de ácido sulfúrico.

Solución de lavado WASHBUF 50x

Un vial (min. 20.0 mL) de solución de lavado buffer concentrada con detergente y conservante. Diluir 1+50 antes de usar.

Plástico de sellado

Film adhesivo, que cobre la microplaca durante la incubación

Materiales requeridos y no suministrados

- Contenedor para la solución de lavado
- Micropipetas de precisión de 15 µL
- Agua destilada
- Multipipetas de 8 canales de 100 µL
- Centrifuga 300 rpm
- Lector de placas

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Para el correcto procedimiento del ensayo, es importante seguir las instrucciones. Antes de utilizar el test, es necesario preparar y equilibrar toda las soluciones a 18-22°C.

Determinar el número de tiras necesarios para el ensayo. Es recomendable tomar dos valores de cada muestra.

Para cada testeo se necesitan un total de 16 pocillos para los estándares y el control

Los inmuntiras que no se vayan a utilizar se guardarán en una bolsa, con cápsulas para evitar la deshidratación.

1. Pipetear 15 µL del estándar CAL 0 -5

control CTRL 1 -2 o las muestra desconocida dentro de los pocillos.

2. Incubación en Inmuntiras

Añadir 100 µL de la Solución del anticuerpo primario Ab en cada pocillo. Cubrir los Inmuntiras con un film adhesivo y proceder a la incubación. Durante 60±5 minutos a una temperatura de 18-22°C. Centrifugar a 300 rpm.

3. Lavado

Lavar las Inmuntiras 5 veces manualmente con 300 µL la solución diluída de lavado, WASHBUF 50x diluir en agua destilada en proporción 1+50. Lavar en una máquina de lavado automática 5 ciclos. Es importante asegurarse de que los pocillos están vacíos antes de iniciar un nuevo ciclo de lavado.

4. Incubación con el Anticuerpo conjugado de la peroxidasa.

Añadir 100 µl del anticuerpo conjugado de la peroxidasa ENZYMCONJ a cada pocillo, cubrir con film adhesivo . Incubar durante 60±5 minutos a 18-22°C. Centrifugar a 300 rpm.

5. Lavado

Proceder como se indica en el apartado 3

6. Incubación con la solución del sustrato cromogénico

Pipetear 100 µL de la solución sustrato SUBS TMB en cada pocillo, cubrir con film adhesivo. Incubar 15±2 minutos a 18-22°C, en ambiente oscuro y centrifugar a 300 rpm. No pipetear directamente desde el vial conteniendo el sustrato TMB, pero transferir el volúmen necesario a un recipiente limpio. Eliminar el residuo. No utilizarlo.

7. Parada de la reacción colorimétrica.

Pipetear 100 µL de la solución de parada H_2SO_4 dentro de cada pocillo.

8. Medida de la absorbancia.

Medir la absorbancia a 450-650 nm en el periodo comprendido de dos horas.

Limitaciones del procedimiento

Si la absorbancia de la muestra supera el estándar 5, la muestra deberá ser diluida en el Estándar 0, y se volverá a analizar.

CONTROL DE CALIDAD

La buena práctica del Laboratorio requiere la utilización de muestras como control de calidad en cada serie de procedimientos, de manera que podamos chequear el rendimiento del ensayo. Los controles se deberán hacer con muestras desconocidas, y los resultados analizados con métodos estadísticos apropiados

RESULTADOS

Calculo de resultados

Los resultados se representan en una Curva Estándar. En las ordenadas se representan los valores duplicados, de la absorbancia correspondiente a los 6 estándares

Draw the best fitting curve. Alternatively, a four-parametric logistic curve fit can be used.

La concentración correspondiente al Crosslaps se representa en la abscisa.

Ejemplo de los resultados obtenidos:

Estándar / Controles / Muestra	CrossLaps Conc. (µg/L)	$A_{450-650}$ (nm)	Media $A_{450-650}$ (nm)	Interpolación CrossLaps Conc. (µg/L)
Standard 0	0	1.950 / 2.027	1.989	
Standard 1	75	1.599 / 1.705	1.652	
Standard 2	250	1.236 / 1.275	1.256	
Standard 3	750	0.785 / 0.850	0.818	
Standard 4	2250	0.472 / 0.496	0.484	
Standard 5	6750	0.267 / 0.285	0.276	
Control 1		0.643 / 0.671	0.657	1193
Control 2		0.440 / 0.468	0.454	2462
Sample I		1.161 / 1.202	1.182	305
Sample II		0.729 / 0.765	0.747	919
Sample III		0.423 / 0.422	0.423	2829

Nota. Los datos arriba expuestos, son para ilustrar el ejemplo y no deben utilizarse para interpretar los resultados de los ensayos realizados.

Cálculo de corrección de los valores del CrossLaps.

La concentración del CrossLaps $\mu\text{g/L}$ en la muestra y la concentración de creatinina ($\text{mM} = \text{mmol/L}$) deberá ser determinada. Para determinar la concentración de creatinina se recomienda utilizar el método Jaffe o equivalentes.

La ecuación de corrección de la variación de concentración de CrossLaps en orina, es la siguiente:

$$\text{Valor Corr. Crosslaps } (\mu\text{g}/\text{mmol}) = \frac{\text{Crosslaps } (\mu\text{g}/\text{L})}{\text{Creatinina } (\text{mM})}$$

Características representadas

Todos los datos se han obtenido de muestras de la segunda orina de la mañana, siempre que no se haga otra indicación.

Límite de la detección: 50 $\mu\text{g/L}$

Esta es la concentración correspondiente a dos desviaciones estándar, por encima de la media de 21 determinaciones de "CrossLaps Estándar 0".

Precisión

Los siguientes resultados fueron obtenidos de 5 ensayos de 4 muestras cada día en 5 días consecutivos. (25 determinaciones en total por cada muestra).

Variación del Interensayo (n=25)

Media ($\mu\text{g/L}$)	SD ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
240	13.68	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

Variación Intraensayo (n=25)

Media ($\mu\text{g/L}$)	SD ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

Dilución / Linealidad

El Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA es lineal en el rango 50 $\mu\text{g/L}$ a 6750 $\mu\text{g/L}$ de las muestras Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA con la concentración de 3450-4340 $\mu\text{g/L}$ CrossLaps fueron diluidas con el estándar 0 y la concentración del CrossLaps fue determinada con Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA: La muestra de orina está ajustada al 100%

Muestra	Dilución	Esperado $\mu\text{g/L}$	Medida $\mu\text{g/L}$	Corregida $\mu\text{g/L}$	Recuperación %
1	neat	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	neat	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	neat	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
Media					101

Recuperación

Las muestras fueron preparadas añadiendo diferentes cantidades de Antígeno CrossLaps a tres diferentes muestras de orina.

Muestra	Initial µg/L	Added µg/L	Esperado µg/L	Medida µg/L	Recuperación %
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
Media					96

Valores esperados

Es recomendable que el laboratorio establezca los valores de normalidad y patológicos. Como ejemplo la media de los valores y la desviación estándar para varias poblaciones se dan en la tabla de abajo; todos los valores han sido establecidos usando muestras de la segunda orina de la mañana.

Población	Número de individuos	Valores medios de Urine CrossLaps (µg/mmol Cr)	95% Confidence Interval (µg/mmol Cr)
Pre-menopausal mujer	175	191	67 – 544
Post-menopausal mujer	250	324	121 – 874
Varones	249	174	54 - 559

Variación individual día a día

La variación intra individual día a día fué calculada analizando muestras de orina (segunda orina de la mañana) procedentes de 14 mujeres post menopáusicas sanas, cinco veces durante dos semanas.

Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA [µg/mmol creatinine]								
Mujer no	Edad	visit 1	visit 2	visit 3	visit 4	visit 5	mean	SD
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
Media	68							16
SD	7.80							10.87

INTRODUÇÃO

Utilização Proposta

O Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA da Osteometer BioTech A/S é um ensaio imuno-absorvente ligado a enzima para a quantificação de produtos de degradação de telopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo-I na urina humana.

O ensaio com Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA deve ser realizado para diagnóstico in vitro como uma indicação da reabsorção óssea humana e pode ser utilizado como um apoio para:

A. Monitoramento das alterações de reabsorção óssea de

- 1) Terapias anti-reabsorção em mulheres após a menopausa:
 - a) Terapias de Reposição Hormonal (HRT) com hormônios e medicamentos que atuam como hormônios.
 - b) Terapias com bifosfonato.
- 2) Terapias anti-reabsorção em indivíduos com diagnóstico de osteopenia;
 - a) Terapias de Reposição Hormonal (HRT) com hormônios e medicamentos que atuam como hormônios.
 - b) Terapias com bifosfonato.
- 3) Terapias anti-reabsorção em indivíduos com diagnóstico de doença óssea de Paget;

B. Prever a Resposta Óssea (Densidade Mineral Óssea) de mulheres após a menopausa sob terapias anti-reabsorção.

- a) Terapias de Reposição Hormonal (HRT) com hormônios e medicamentos que atuam como hormônios.
- b) Terapias com bifosfonato.

Limitações

A utilização do teste não foi estabelecida para prever o desenvolvimento de osteoporose ou risco de fratura no futuro.

A utilização do teste não foi estabelecida em hiperparatiroidismo ou hipertiroidismo.

Quando o teste é utilizado para o monitoramento de uma terapia, os resultados podem ser confundidos em pacientes portadores de condições clínicas conhecidas por afetarem a reabsorção óssea, exemplo: metástase óssea, hiperparatiroidismo ou hipertiroidismo. Os resultados do Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA devem ser interpretados em conjunto com descobertas clínicas e outros resultados de diagnóstico e não devem ser utilizados como único determinante para o início ou a alteração de uma terapia.

Resumo e explicação do teste

A osteoporose é uma séria doença etária que afeta mais de 30% da população feminina com mais idade e 5-10% da população masculina com fraturas osteoporóticas.

O risco maior do tempo de vida para mulheres é causado principalmente devido ao pico menor de massa óssea e a perda óssea acelerada após a menopausa.

A vasta maioria das fraturas ocorrem em mulheres idosas e a incidência aumenta com a idade.

As regiões do esqueleto onde a maior parte das fraturas osteoporóticas ocorrem são: quadris, espinha/vertebral ou pulso/antebraço.

O tecido ósseo está sendo remodelado constantemente. Este é um processo pelo qual os ossos do esqueleto estão sendo continuamente renovados através da remoção óssea. Os ossos mais antigos são substituídos pela síntese de uma nova matriz óssea, sendo subsequente mineralizados.

Após a menopausa, a taxa de reabsorção óssea aumenta e como consequência, a massa óssea diminui.

A massa óssea é normalmente determinada com raios-X ou rastreamento por ultra-som, podem ser determinada no esqueleto total ou em partes localizadas como espinha, quadris ou antebraço.

Um grupo de estudo sob o WHO apresentou a seguinte sugestão para uma definição de osteoporose.

Categoria Definição pela densidade óssea

Normal Um valor para densidade mineral óssea ou conteúdo mineral ósseo que não é maior do que 1 Desvio Padrão abaixo do valor médio do adulto jovem.

Baixa massa óssea(ou osteopenia) Um valor para densidade mineral óssea ou conteúdo mineral ósseo que está localizado entre 1 e 2,5 Desvios Padrões abaixo do valor médio do adulto jovem.

Osteoporose Um valor para densidade mineral óssea ou conteúdo mineral ósseo que é maior do que 2,5 Desvios Padrões abaixo do valor médio do adulto jovem.

Osteoporose Severa(ou osteoporose estabelecida) Um valor para densidade mineral óssea ou conteúdo mineral ósseo que é maior do que 2,5 Desvios Padrões abaixo do valor médio do adulto jovem na presença de uma ou mais fraturas de fragilidade.

Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N: The Diagnosis of osteoporosis J. Bone Miner Res 1994 9 1137-41

O colágeno Tipo-I responde por mais de 90% da matriz orgânica do osso e é sintetizado primariamente no mesmo (1). Durante a renovação do esqueleto, o colágeno Tipo-I é degradado e pequenos fragmentos de peptídeos são expelidos para a urina. O Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA está baseado em dois anticorpos policlonais (coelhos) reativos com a seqüência de aminoácido EK AHD-β-GGR, onde o resíduo do ácido aspártico (D) é β-isomerizado.

Princípios do procedimento

O ensaio está baseado na combinação competitiva dos anticorpos anti-CrossLaps com o antígeno solúvel CrossLaps ou com as cavidades de microtitulação revestidas com o antígeno CrossLaps. Primeiramente, os padrões, os controles ou as amostras desconhecidas são pipetadas nas cavidades. Então, os anticorpos anti-CrossLaps são adicionados e uma incubação de 1 hora a temperatura ambiente é realizada. As cavidades são lavadas e a imunoglobulina de anti-coelho conjugada com peroxidase é adicionada. As cavidades são então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após uma segunda etapa de lavagem, as cavidades são incubadas por 15 minutos com um substrato cromogênico. A reação é interrompida e a absorbância é medida.

PRECAUÇÕES

Avsisos e precauções Para utilização *in vitro*:

As precauções a seguir devem ser observados no laboratório:

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos no mesmo local onde os materiais de imunodiagnóstico estão sendo armazenados.
- Não utilize a boca para pipetar.
- Utilize luvas ao manusear materiais de imunodiagnóstico e lave bem as mão após este manuseio.
- Cubra a área de trabalho com papel absorvente descartável.

AVISO: MATERIAL BIOLÓGICO POTENCIALMENTE PERIGOSO

Os reagentes deve ser manuseados no Nível de Bio-segurança 2, segundo recomendado para amostras de urina humana potencialmente infecciosas, no manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" de 1998, dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health.

Armazenamento

Armazene a embalagem após o recebimento a 2-8°C. Sob estas condições, os reagentes permanecerão estáveis até a data de vencimento marcada em cada embalagem.

MATERIAIS

Coleta da amostra

Os níveis de peptídeos medidos pelo Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA na urina não apresentam variações em função da dieta ingerida; no entanto, para obter-se consistência, recomenda-se a utilização da segunda urina da manhã. Além disso, para o monitoramento do paciente, as amostras de acompanhamento devem ser coletadas sob as mesmas condições da amostra da linha base (sita é, a segunda urina da manhã).

Observe que para obter-se resultados ótimos, recomenda-se centrifugar as amostras (exemplo: 2000g; 10 minutos). Mantenha a amostra de urina resfriada (2-8°C) para armazenamento durante período inferior a uma semana, ou congelada (< -18°C) para período maiores.

As amostras obviamente contaminadas com sangue integral devem interferir no desempenho do ensaio. Estas amostras devem ser descartadas e deve ser realizada a coleta de uma nova amostra.

Materiais fornecidos

Antes de abrir o kit, realize a leitura da seção Precauções. Esta seção abrange o manuseio seguro e o descarte dos reagentes que contém urina humana. Cada kit contém reagentes suficientes para 96 determinações (seis tiras com microcavidades, 2x8 cavidades cada).

Imunotiras MICROPLAT

Tiras de micropoços (12 x 8 poços) revestidas previamente com antígeno sintético CrossLaps, fornecidas numa armação de plástico.

Padrão CrossLaps CAL₀

Um frasco (min. 11 mL/frasco) de tampão pronto para o uso, com estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Padrão CrossLaps CAL₁₋₅

Cinco frascos (min. 0.4mL/frasco) contendo padrões CrossLaps em tampão, pronto para o uso, contendo também estabilizador de proteína, detergente e conservante. A concentração exata do antígeno CrossLaps está assinalada em cada frasco e na Folha Técnica de Dados incluída. O valor exacto de cada Padrão encontra-se impresso no relatório do controlo da qualidade

Controle de Urina CTRL₁₋₂

Um frasco (min. 0.4mL/frasco) contendo urina humana em tampão, pronto para o uso, contendo também estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Solução Primário de Anticorpo AB

Um frasco (min. 12 mL) de anticorpos anti-CrossLaps criados em coelhos, pronto para o uso. Preparado em um tampão contendo estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Anticorpo Conjugado com Peroxidase ENZYMCONJ

Um frasco (min. 12 mL) de anticorpos anti-coelho conjugados com peroxidase da raiz-forte em tampão contendo estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Solução de Substrato SUBS TMB

Um frasco (min. 12 mL) de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), pronto para o uso, em uma solução ácida.

Observe que o substrato cromogênico pode parecer ligeiramente azulado.

Solução Stop H₂SO₄

Um frasco (min. 12 mL) de ácido sulfúrico 0.18 M pronto para o uso.

Tampão para Lavagem WASHBUF_{50x}

Um frasco (min. 20 mL) de tampão concentrado para lavagem, com detergente e conservante. Dilua 1+50 em água destilada antes de utilizar.

Fita selante

Filme adesivo para cobrir as cavidades durante a incubação.

Materiais necessários – não fornecidos

- Recipientes para preparação da Solução para Lavagem.
- Micropipetas de precisão para dispensar 15 µL.
- Água destilada.
- Multipipeta de precisão com 8 canais para dispensar 100 µL.
- Agitador de microcavidades (300 rpm).
- Leitor de placa ELISA com filtros de 450 nm e 650 nm.

PROCEDIMENTO PARA O ENSAIO

Antes da utilização, ajuste a temperatura de todas as soluções para a temperatura ambiente. O ensaio deve ser realizado a temperatura ambiente (18-22°C).

Determine o número de tiras necessárias para o ensaio. Recomenda-se testar todas as amostras em duplicata. Além disso, para cada corrida de análises, um total de 16 cavidades são necessárias para os padrões e para o controle. Coloque o número adequado de tiras na suporte plástico. Armazene as imunotiras na embalagem plástica totalmente fechada com cápsulas de absorção de umidade.

1. Pipete os Padrões ou amostras

Pipete 15 µL de cada Padrão [CAL] 0-5, do Controle [CTRL] 1-2 ou das amostras desconhecidas nas cavidades adequadas.

2. Incubação em Imunotiras

Adicione 100 µL da Solução Primária de Anticorpo [AB] em cada cavidade. Cubra as imunotiras com fita selante e incube por 60±5 min. a temperatura ambiente, no agitador de placa de microtitulação (300 rpm).

3. Lavagem

Lave manualmente as imunotiras por 5 vezes com 300 µL Tampão para Lavagem Diluída ([WASH] 50x) diluído 1+50 com água destilada). Certifique-se de que as cavidades fiquem completamente vazias após cada ciclo de lavagem. Para a utilização de um lavador automatizado de placas, sigas as instruções do fabricante ou as diretrizes do laboratório. Normalmente, 5 ciclos de lavagem são suficientes.

4. Incubação com Anticorpo Conjugado com Peroxidase

Adicione 100 µL do Anticorpo Conjugado com Peroxidase [ENZYMCON] em cada cavidade, cubra com fita selante e incube por 60±5 minutos a temperatura ambiente, no agitador (300 rpm).

5. Lavagem

Proceda segundo descrito na etapa 3.

6. Incubação com solução de substrato cromogênico

Pipete 100 µL de Solução de Substrato [SUBS] TMB em cada cavidade, cubra com fita selante e incube por 15±2 minutos no escuro, com o agitador (300 rpm). Não pipete diretamente do frasco contendo o substrato TMB - transfira o volume necessário para um recipiente limpo. O substrato remanescente neste recipiente deve ser descartado e não deve ser retornado para o frasco.

7. Interrompendo a reação de desenvolvimento de cor

Adicione 100 µL de Solução Stop [H₂SO₄] em todas as cavidade.

8. Medição da absorbância

A absorbância é medida dentro de 2 horas em 450 nm. Recomenda-se utilizar a leitura em 650 nm como referência.

CONTROLE DE QUALIDADE

A Boa Prática Laboratorial para o Controle de Qualidade exige a utilização de amostras de controle de qualidade em cada série de ensaios, com o objetivo de verificar o desempenho do ensaio. Os controles devem ser tratados como amostras desconhecidas e os resultados devem ser analisados com métodos estatísticos adequados.

RESULTADOS

Cálculo dos Resultados

Calcule a média das determinações de absorbância em duplicata. Construa uma curva padrão em um papel gráfico logarítmico-linear, posicionando as absorbâncias médias dos seis Padrões (ordenada) contra as concentrações correspondentes de CrossLaps (abscissa). Estabeleça a curva de melhor tendência. De forma alternativa, uma curva de tendência logística de quatro parâmetros pode ser utilizada.

Determine a concentração de CrossLaps do Controle e de cada amostra de paciente através de interpolação na curva.

A concentração de CrossLaps determinada para o Controle deve estar na faixa estabelecida no documento incluso no kit. Se isto não ocorrer, uma investigação deve ser realizada para descobrir se a causa desta diferença é a técnica imprecisa, o manuseio inadequado dos reagentes ou a deterioração dos reagentes.

As amostras dos pacientes com valores de absorvância abaixo do valor do maior padrão (5) deve ser diluídas previamente na proporção 1+4 com o padrão 0 em um tubo de ensaio, e então reanalisadas de acordo com o procedimento de ensaio. Após a análise, multiplique o resultado pelo fator de diluição. Como um diretriz, IDS Ltd recomenda apenas a utilização dos resultados de análise onde as determinações em duplicata são similares, exemplo: com um CV abaixo de 15% para valores acima de 500 µg/L e Desvio Padrão abaixo de 50 µg/L para valores abaixo de 500 µg/L.

Exemplos de resultados obtidos:

Padrões/ Controles/ Amostras	Conc.de CrossLaps (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Média A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolado Conc. de CrossLaps (µg/L)
Padrão 0	0	1.950 / 2.027	1.989	
Padrão 1	75	1.599 / 1.705	1.652	
Padrão 2	250	1.236 / 1.275	1.256	
Padrão 3	750	0.785 / 0.850	0.818	
Padrão 4	2250	0.472 / 0.496	0.484	
Padrão 5	6750	0.267 / 0.285	0.276	
Controle 1		0.643 / 0.671	0.657	1193
Controle 2		0.440 / 0.468	0.454	2462
Amostra I		1.161 / 1.202	1.182	305
Amostra II		0.729 / 0.765	0.747	919
Amostra III		0.423 / 0.422	0.423	2829

Observação: Os dados acima são apenas ilustrativos e não devem ser utilizados para calcular os resultados de nenhum ensaio.

Cálculo do valor corrigido de CrossLaps

Para cada amostra, a concentração de CrossLaps (µg/L) e a concentração de creatinina (mM = mmol/L) deve ser determinada. Para a determinação de creatinina, o método de Jaffe (3) ou um método equivalente é recomendado.

A equação a seguir corrige a concentração de CrossLaps para a variação na concentração de urina:

$$\text{Valor Corrigido de CrossLaps (µg/mmol)} = \frac{\text{CrossLaps (µg/L)}}{\text{Creatinina (mM)}}$$

Características de Desempenho

Todos os dados de desempenho foram estabelecidos utilizando amostras de segunda urina da manhã, a menos que indicado de outra forma.

Limite de Detecção: 50 µg/L

Esta é a concentração correspondente a dois desvios padrões acima da média de 21 determinações do Padrão 0 de CrossLaps.

Precisão

Os resultados a seguir foram obtidos pela análise de cinco replicatas de quatro amostras de cada dia, durante cinco dias consecutivos (25 determinações no total para cada amostra):

Variação Intra- Ensaio

Média (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	13.68	5.7
480	13.92	2.9
1340	46.90	3.5
3790	20.47	5.4

Variação Inter- Ensaio

Média (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
240	22.56	9.4
480	25.92	4.7
1340	62.98	4.7
3790	32.59	8.6

Diluição/ Linearidade

Três amostras de urina foram diluídas com o Padrão 0 e analisadas após a diluição. A amostra pura de urina está ajustada para 100%.

Os resultados estão apresentados na tabela abaixo:

Amostra	Diluição	Esperado µg/L	Medido µg/L	Corrigido µg/L	Recuperação %
1	Puro	3450	3450	3450	100
	1:2	1730	1680	3360	97
	1:4	860	790	3160	92
	1:8	430	440	3520	102
2	Puro	4060	4060	4060	100
	1:2	2030	2200	4400	108
	1:4	1015	1070	4280	105
	1:8	508	550	4400	108
3	Puro	4340	4340	4340	100
	1:2	2170	2180	4380	101
	1:4	1085	1150	4600	106
	1:8	443	510	4080	94
Média				101	

Recuperação

As amostras misturadas foram preparadas através de adição de diferentes quantidades do antígeno CrossLaps em três amostras diferentes de urina.

Amostra	Inicial µg/L	Adicionado µg/L	Esperado µg/L	Medido µg/L	Recuperação %
1	410	130	540	560	106
	410	380	790	870	110
	410	1130	1540	1670	108
2	500	130	630	560	89
	500	380	880	790	90
	500	1130	1630	1590	98
3	520	130	650	590	91
	520	380	900	790	88
	520	1130	1650	1390	84
Mean					96

Valores esperados

É aconselhável que o laboratório estabeleça sua própria faixa de valores normais e patológicos. Como exemplo, os valores médios e os desvios padrões para várias populações estão listados abaixo. Todos os valores foram determinados utilizando-se a segunda urina da manhã.

Para maiores informações, consulte a lista de referências.

População	Número de indivíduos	Valores médios (faixa observado) (µg/mmoL Cr)	95% Confidence Interval (µg/mmoL Cr)
Mulher antes da menopausa	175	191	67 – 544
Mulher após menopausa	250	324	121 – 874
Homem	249	174	54 – 559

Varição Intra-Individual Dia a Dia

A Varição Intra-Individual Dia a Dia foi avaliada através da análise de amostras de urina (segunda urina da manhã) de 14 mulheres saudáveis, após menopausa, em cinco pontos ao longo de 2 semanas.









Urine CrossLaps® (CTX-I) EIA [µg/mmol de creatinina]								
Nº de mulheres	Idade	visit 1	visit 2	visit 3	visit 4	visit 5	média	Desvio padrão
001	75	368	331	299	290	307	319	31
002	75	239	261	240	267	247	251	13
003	72	200	193	182	183	185	188	8
004	74	220	218	203	236	203	216	14
005	65	76	78	83	81	72	78	4
006	63	71	52	65	57	59	61	7
007	72	101	135	153	125	106	124	21
008	65	110	104	129	148	141	126	19
009	74	128	134	134	98	131	125	15
010	73	107	131	140	141	117	127	15
011	60	109	124	107	109	114	113	7
012	54	98	112	107	104	113	107	6
013	53	362	433	424	392	479	418	44
014	73	117	142	136	111	99	121	18
media	68							16
desvio padrão	7.80							10.87

Example Version

REFERENCES

1. Burgeson RE. New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* (1988); 4: 551-577.
2. Bonde M. et al., Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* (1994); 40: 2022-2025.
3. Jaffé M. Über den niederschlag, welche pikrinsäure in normalem harn erzeugt und über eine neue reaktion des creatinins. *Hoppe Seylers Z Phys Chem* (1886); 10:391-400.
4. Garnero P. et al., Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* (1994); 79: 780-785.
5. Bonde M. et al., Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps) - follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab* (1995); 80: 864-868.
6. Delmas PD. et al., A combination of low doses of 17 beta-estradiol and norethisterone acetate prevents bone loss and normalizes bone turnover in postmenopausal women. *Osteoporos Int* (2000); 11: 177-187.
7. Ravn P. et al., Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* (2002); 30: 320-324.
8. Buclin T. et al., Bioavailability and biological efficacy of a new oral formulation of salmon calcitonin in healthy volunteers. *J Bone Miner Res* (2002); 17: 1478-1485.
9. Ravn P. et al., Changes in biochemical markers and bone mass after withdrawal of ibandronate treatment: prediction of bone mass changes during treatment. *Bone* (1998); 22: 559-564.
10. Fledelius C. et al., Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem* (1997); 272: 9755-9763.
11. Garnero P. et al., Do markers of bone resorption add to bone mineral density and ultrasonographic heel measurement for the prediction of hip fracture in elderly women? The EPIDOS prospective study. *Osteoporos Int* (1998); 8: 563-569.
12. Bjarnason NH and Christiansen C. Early response in biochemical markers predicts long-term response in bone mass during hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Bone* (2000); 26: 561-569.
13. Delmas PD. et al., M. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone* (2000); 26: 553-560.
14. Tsai KS. et al., Raloxifene versus continuous combined estrogen/progestin therapy: densitometric and biochemical effects in healthy postmenopausal Taiwanese women. *Osteoporos Int* (2001); 12: 1020-1025.
15. Peichl P. et al., Serum osteocalcin and urinary crosslaps are suitable markers of bone turnover in response to short-term hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* (2000); 14: 374-381.
16. Hoshino H. et al., Urinary excretion of type I collagen degradation products in healthy women and osteoporotic patients with vertebral and hip fractures. *Calcif Tissue Int* (1998); 62: 36-39.

Doc: AC-03PL-A
Version: 08
Date: 28 Sep 2022

 EXP	GB Use By DE Verwendbar bis ES Fecha de caducidad IT Utilizzare entro FR Utiliser jusque NL Houdbaar tot DK Holdbar til CZ Použitelné do SK Použitelné do GR Ημερομηνία λήξης PT Prazo de validade HU Felhasználható SE Använd före PL Użyć przed	 LOT	GB Batch code DE Chargenbezeichnung ES Código de lote IT Codice del lotto Code du lot NL Lot nummer DK Lotnummer CZ Číslo šarže SK Číslo šarže GR Αριθμός Παρτίδας PT Código do lote HU Szrzszzám SE Lot nummer PL Kod partii
 REF	GB Catalogue number DE Bestellnummer ES Número de catálogo IT Numero di catalogo FR Référence du catalogue NL Catalogus nummer DK Katalognummer CZ Katalogové číslo SK Katalógové číslo GR Αριθμός καταλόγου PT Referência de catálogo HU Katalógusszám SE Katalognummer PL Numer katalogowy		GB Manufacturer DE Hersteller ES Fabricante IT Fabbicante FR Fabricant NL Fabrikant DK Producent CZ Výrobce SK Výrobca GR Κατασκευαστής PT Fabricante HU Gyártó SE Tillverkare PL Producent
 Σ	GB Contains sufficient for <n> tests DE Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen ES Contenido suficiente para <n> ensayos IT Contenuto sufficiente per "n" saggi FR Contenu suffisant pour "n" tests NL Inhoud voldoende voor "n" testen DK Indeholder tilstrækkeligt til "n" test CZ Lze použít pro <n> testů SK Obsah postačuje na <n> stanovení GR Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις PT Conteúdo suficiente para "n" ensaios HU A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő SE Räckert till "n" antal tester PL Wystarczy na wykonanie <n> testów	 IVD	GB In-Vitro Diagnostic Medical Device DE In-Vitro-Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro NL Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek DK Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik CZ In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek SK Zdravotnícka pomocka in vitro GR In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν PT Dispositivo médico para diagnóstico in vitro HU In vitro diagnosztikum SE Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik PL Wyrób do diagnostyki In Vitro
	GB Temperature limitation DE Temperaturbegrenzung ES Límite de temperatura IT Limiti di temperatura FR Limites de température NL Temperatuurlimiet DK Temperaturbegrænsning CZ Teplotní rozmezí od do SK Teplotné rozmedzie od do GR Περιορισμοί θερμοκρασίας PT Limites de temperatura HU Hőmérsékletartomány SE Temperaturbegränsning PL Przestrzegać zakresu temperatury		GB Consult Instructions for Use DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consulte las instrucciones de uso IT Consultare le istruzioni per l'uso FR Consulter les instructions d'utilisation NL Raadpleeg de gebruiksaanwijzing DK Se brugsanvisning CZ Viz návod k použití SK Vid' návod na použitie GR Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης PT Consulte as instruções de utilização HU Nézze meg a Használati utasítást SE Se handhavandebeskrivningen PL Sprawdź w instrukcji obsługi

	GB EU Importer DE EU-Importeur ES UE Importador IT Importatore UE FR Importateur UE NL EU Importeur DK EU Importør CZ EU Dvozcce SK Dovozca z EÚ GR Εισαγωγέας ΕΕ PT Importador UE HU EU importőr SE EU Importör PL Importer w UE
---	--



Immunodiagnostic Systems Limited,
10 Didcot Way, Boldon Business Park,
Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
Tel.: +44 191 519 0660
Fax: +44 191 519 0760
E-Mail: info.uk@idsplc.com
www.idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
Herriotstrasse 1
60528 Frankfurt am Main
Germany