

Urine BETA CrossLaps[®] (CTX-I)ELISA

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

Zur quantitativen Bestimmung von Abbauprodukte von C-terminalen Telopeptide von Type-I Kollagen in menschlichem Urin

Per la determinazione quantitativa nelle urine dei prodotti di degradazione del telopeptide C-terminale del collagene umano di Tipo I

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

Til kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter af C-terminal telopeptid fra type-I kollagen i human urin.

För kvantifiering av nedbrytningsprodukter av C-terminal telopeptider av typ I kollagen i human urin

Na kvantifikaci degradačních produktů C-terminálních telopeptidů kolagenu typu I v lidské moči.

English	3
Deutsch	9
Italiano.....	15
Português.....	20
Dansk.....	25
Svenska	30
česky	35

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 BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA kit nor for any consequences such interpretations may cause.

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 BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA gemacht wurden oder für jegliche Konsequenzen, die solche Interpretationen verursachen.

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 BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA, né per le eventuali conseguenze che tale interpretazione possa provocare.

A Immunodiagnostic Systems Limited não se responsabilizará por nenhuma outra utilização para o kit ou consequência desta utilização, além da aqui especificada. Também não será responsável pela utilização inadequada, como por exemplo: utilização que difere do procedimento descrito neste manual.

Além disso, a Immunodiagnostic Systems Limited não pode ser responsabilizada por quaisquer diagnósticos ou conclusões realizadas pelo usuário ou por terceiros com base nos resultados obtidos com o kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA ou quaisquer consequências que estas interpretações possam causar.

Immunodiagnostic Systems Limited er ikke ansvarlig for nogen anden brug af kittet, eller konsekvenser heraf, end den, der er specificeret ovenfor. Ej heller er Immunodiagnostic Systems Limited ansvarlig for misbrug af kittet, f.eks. ved at følge en procedure, der afviger fra nærværende instruktioner.

Immunodiagnostic Systems Limited är inte ansvarigt för någon annan användning eller konsekvens av användning än den ovan specificerade. Ej heller för missbruk, dvs användande som avviker från proceduren beskriven i denna manual. Immunodiagnostic Systems Limited kan inte göras ansvarigt för användarens eller tredje parts diagnos eller slutsatser baserade på resultat av Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA kit eller för några konsekvenser av tolkningen av dessa resultat.

Immunodiagnostic Systems Limited neodpovídá za jakékoliv jiné použití tohoto produktu nebo za následky z toho plynoucí. Rovněž neodpovídá za nesprávné použití, tedy použití jiné než je uvedeno v tomto návodu.

Dále není Immunodiagnostic Systems Limited odpovědný za jakékoliv diagnózy nebo závěry provedené uživatelem nebo třetí stranou na základě výsledků získaných s kitem BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA kit, ani za žádné následky, které by mohla taková interpretace způsobit.

INTRODUCTION

Intended use

The Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA is an enzyme immunological test for the quantification of degradation products of C-terminal telopeptides of Type-I collagen in human urine.

The Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA assay is intended for *in vitro* diagnostic use as an indication of human bone resorption 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

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.

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 BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA. Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA demonstrate a high correlation to corresponding measurement of serum samples in Serum CrossLaps® (CTX-I)ELISA. Serum CrossLaps® (CTX-I)ELISA has been reported to be useful for follow-up of anti-resorptive treatment of patients with metabolic bone diseases (3 17).

Principle of the procedure

The Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA is based on two highly specific monoclonal antibodies against the amino acid sequence of EKAHD- β -GGR, where the aspartic acid residue (D) is β -isomerized. In order to obtain a specific signal in the Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA, two chains of EKAHD- β -GGR must be cross-linked.

Standards, controls, or unknown urine samples are pipetted into the appropriate microtitre wells coated with streptavidin, followed by application of a mixture of a biotinylated antibody and a peroxidase-conjugated antibody. Then, a complex between CrossLaps antigens, biotinylated antibody and peroxidase-conjugated antibody is generated, and this complex binds to the streptavidin surface via the biotinylated antibody. Following the one-step incubation at room temperature, the wells are emptied and washed. A chromogenic substrate is added and the colour reaction is stopped with sulfuric acid. Finally, the absorbance is measured.

PRECAUTIONS

The following precautions should be observed in the laboratory:

- Do not eat, drink, or smoke 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 BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA 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

As bone resorption has a marked circadian variation primarily regulated by food intake (18), it is recommended to use second morning void urines obtained after an overnight fast.

Keep the urine sample refrigerated (2-8°C) for storage less than one week, or freeze the sample

(<-18°C) for longer storage. Please note that for optimal results it is recommended to mix the samples and then centrifuge the samples (e.g. 2000g; 10 min) before testing.

Materials supplied

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

Streptavidin coated microtitre plate **MICROPLAT**

Microwell strips (12x8 wells) pre-coated with streptavidin. Supplied in a plastic frame.

CrossLaps Standard **CAL - 0**

One vial (min. 10.0 mL/vial) of ready-for-use PBS buffered solution with protein stabiliser and preservative.

CrossLaps Standards **CAL 1 - 5**

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

Controls **CTRL 1 - 2**

Two vials (min. 0.4mL/vial) CrossLaps peptide in a PBS-buffered solution with protein stabiliser and preservative. Please refer to enclosed QC Report for control range.

Biotinylated Antibody **Ab BIOTIN**

One vial (min. 0.25 mL) of a concentrated solution of a biotinylated monoclonal murine antibody specific for degradation products of C-terminal telopeptides of type I collagen. Prepared in a buffered solution with protein stabiliser and preservative.

Peroxidase Conjugated Antibody **ENZYMCONJ**

One vial (min. 0.25 mL) of a concentrated solution of a peroxidase conjugated murine monoclonal antibody specific for degradation products of C-terminal telopeptides of type I collagen. Prepared in a buffered solution with protein stabiliser and preservative.

Incubation Buffer **BUF**

One vial (min. 19 mL) of a ready-for-use buffered solution with protein stabiliser, detergent, and preservative.

Substrate Solution **SUBS TMB**

One vial (min. 12 mL) of a ready-for-use tetramethylbenzidine (TMB) substrate in an acidic buffer. Please note that the chromogenic substrate might appear slightly bluish.

Stopping Solution **H2S04**

One vial (min. 12 mL) of ready-for-use 0.18 mol/L sulfuric acid.

Washing Buffer **WASHBUF 50x**

One vial (min. 20 mL) of a concentrated washing buffer with detergent and preservative.

Sealing tape

Adhesive film for covering wells during incubation.

Materials required — not supplied

- Containers for preparing the Antibody Solution and the Washing Solution
- Precision micropipettes to deliver 10-200 µL
- Distilled water
- Precision 8- or 12-channel multipipette to deliver 100 µL and 150 µL
- Microwell mixing apparatus
- Microtiter plate reader

ASSAY PROCEDURE

Assay Procedure

For optimal performance of the assay, it is important to comply with the instructions given below. Equilibrate all reagents to room temperature (18-22°C) prior to use. 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 controls. Place the appropriate number of strips in the plastic frame. Store unused immunostrips in the tightly closed foil bag with desiccant capsules. Mix all reagents and samples before use (avoid foam).

1 Preparation of the Antibody Solution:

ATTENTION: Prepare the **Antibody Solution** maximum 30 minutes before starting the assay. Mix the Biotinylated Antibody **Ab BIOTIN** Peroxidase Conjugated Antibody **ENZYMCONJ** and Incubation Buffer **BUF** in the volumetric ratio 1+1+100 in an empty container. Mix carefully and avoid formation of foam. **Prepare a fresh solution before each run of the assay.**

2 Pre-dilution of test specimens

All specimens (unknown samples and **CTRL 1 - 2**), except the standards delivered with the kit must be pre-diluted 1+3 in standard 0 prior to testing (e.g. 20 µL+60 µL).

3 One Step incubation

Pipette 10 µL of un-diluted **Standards CAL 0 -5**, pre-diluted **Controls**, and pre-diluted unknown samples into appropriate wells followed by 150 µL of the **Antibody Solution**. Cover the immunostrips with sealing tape and incubate for 120±5 minutes at room temperature (18-22°C) on a microtitre plate mixing apparatus (300 rpm).

4 Washing

Wash the immunostrips 5 times manually with 300 µL **Washing Buffer (WASHBUF 50x)** diluted 1+50 in distilled water). Using an automated 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.

5 Incubation with chromogenic substrate solution

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

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.

6 Stopping of colour reaction

Pipette 100 µL of the **Stopping Solution** into each well.

7 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 **Standard 5**, the sample should be further 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 analysed with appropriate statistical methods.

RESULTS

Calculation of results

A quadratic curve fit should be used.

Alternatively, calculate the mean of the duplicate absorbance determinations. Construct a standard curve on graph paper by plotting the mean absorbances of the six standards (ordinate) against the corresponding CrossLaps concentrations (abscissa). Determine the CrossLaps concentration of the controls and each patient sample by interpolation.

Example of results obtained

Standards/ Controls/ Samples	CrossLaps conc. (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	Mean A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolated CrossLaps conc. (µg/L)	Conc. Corrected for 4X dilution (µg/L)
Standard 0	0.00	0.046 / 0.045	0.046		
Standard 1	1.43	0.164 / 0.160	0.162		
Standard 2	4.24	0.402 / 0.383	0.393		
Standard 3	8.27	0.742 / 0.700	0.721		
Standard 4	16.6	1.461 / 1.366	1.414		
Standard 5	23.7	2.027 / 1.923	1.975		
Control 1		0.327 / 0.319	0.323	3.38	13.5
Control 2		1.216 / 1.173	1.195	14.0	55.9
Sample I		0.162 / 0.150	0.156	1.36	5.44
Sample II		0.507 / 0.500	0.504	5.56	22.2
Sample III		1.173/ 1.082	1.128	13.2	52.6

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 (ng/mL) and the creatinine concentration should be determined. Determine the concentration of creatinine (mmol/L) in the sample using a routine enzymatic colorimetric method for clinical chemistry analysers, and perform the correction using the equation:

$$\text{Corr. CrossLaps Value } (\mu\text{g}/\text{mmol}) = \frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Creatinine (mM)}}$$

Performance characteristics

Detection limit: 0.80 µg/L CrossLaps

This is the concentration corresponding to three standard deviations above the mean of 21 determinations of the blank ("CrossLaps Standard 0") multiplied by the dilution factor 4.

Precision ≤ 6.9%

The precision of the Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA was evaluated for three urine samples. The results are summarised in the table below (the results have not been corrected by dilutionfactor).

Intraassay ≤ 3.9% (n=10)			Interassay ≤ 6.9% (n=10)		
Mean (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)	Mean (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Dilution/Linearity

The Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA is linear in the range 0.20 ng/mL to 40.7 ng/mL of CrossLaps.

Urine samples with the concentration of 16.7 – 52.8 ng/mL CrossLaps were diluted with standard 0 and the

concentration of CrossLaps were determined with Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA.

The data below is calculated from 3 different urine samples

Dilution Procedure								
Urine [%]	Std. 0 [%]	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Overall recovery (%)
		Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	
100	0	16,68	100	23,36	100	52,80	100	100
90	10	15,00	103	21,00	105	47,52	110	106
80	20	13,32	100	18,68	104	42,24	109	104
70	30	11,68	95	16,36	99	36,96	110	101
60	40	10,00	96	14,00	98	31,68	104	99
50	50	8,32	97	11,68	88	26,40	99	95
40	60	6,68	96	9,32	87	21,12	94	93
30	70	5,00	96	7,00	88	15,84	84	90
20	80	3,32	96	4,68	86	10,56	84	89
10	90	1,68	87	2,32	90	5,28	76	85
Mean								96

RC: Recovery, Exp: Expected

Expected values

It is advisable for a laboratory to establish its own range of normal and pathological values.

Populations	Number of subjects (n)	Age (Years)	Geometric Mean Values (µg/mmol)	95% CI
Pre-menopausal women	25	40-49	1.66	0.83-3.32
Post-menopausal women	272	52-75	2.27	0.73-7.07
Males	25	50-78	1.46	0.53-4.04

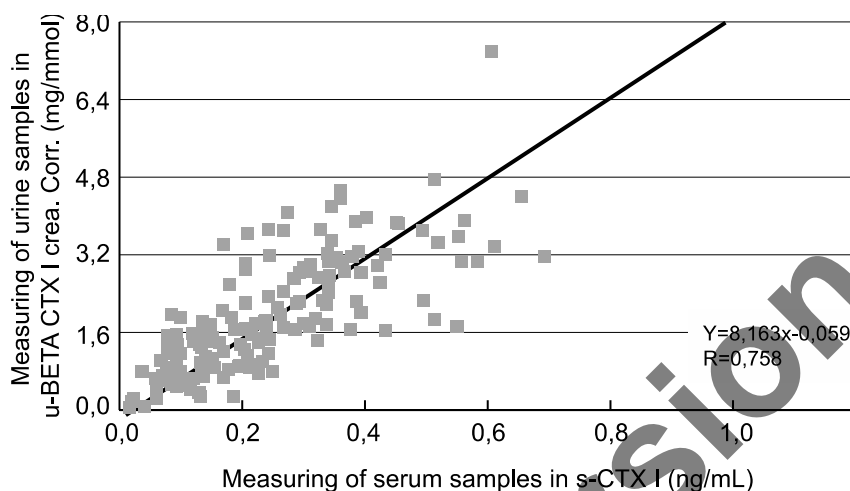
Day to Day Individual Variation

The Day to Day Intra-individual Variation was assessed by analyzing urine samples (morning fasting) from 11 healthy post menopausal women at five time points over 2 weeks

Subject No	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA (µg/mmol)					Mean (µg/mmol)	SD (µg/mmol)	CV (%)
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

CLINICAL DATA

Correlation between serum samples measured in Serum CrossLaps® (CTX-I)ELISA and corresponding urine samples measured in Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA (n=159). The 159 samples are from pre- and postmenopausal women before and after anti-resorptive therapy, as well as males. The women were treated with Ibandronate, Raloxifene, Drospirone, or Aerodin



Anti-resorptive therapies

Below is the Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA data [$\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine] from two anti-resorptive studies. The geometric mean value and the 95% confidence interval of mean are shown.

Bisphosphonate

- Postmenopausal women between age 55 and 75 years, more than 5 years since menopause, and a BMD of spine or femoral neck at osteoporotic level
- 20 participants received placebo (500 calcium and 400 mg vitamin D daily)
- 20 participants received active treatment (2.5 mg Ibandronate, 500 mg calcium, and 400 mg vitamin D daily)
- Treatment period 1 year

	Placebo group Mean [95% CI] ($\mu\text{g}/\text{mmol}$)	Bisphosphonate group Mean [95% CI] ($\mu\text{g}/\text{mmol}$)
Baseline	2.69 [2.11;3.42]	2.17 [1.49;3.14]
After 6 months of treatment	1.97 [1.36;2.85]	0.67 [0.43;1.04]
After 12 months of treatment	1.92 [1.39;2.65]	0.53 [0.29;0.95]

HRT

- Postmenopausal women between age 45 and 65 years, more than 2 years since menopause, and a BMD of hip within the reference range of premenopausal women
- 57 participants received placebo (500 mg calcium)
- 175 participants received active treatment (1 mg of estradiol continuously combined with 1 mg of drospirenone (n=59), 2 mg of drospirenone (n=58), or 3 mg of drospirenone (n=58))
- Treatment period 2 years

	Placebo group Mean [95% CI] ($\mu\text{g}/\text{mmol}$)	HRT group Mean [95% CI] ($\mu\text{g}/\text{mmol}$)
Baseline	2.11 [1.84;2.42]	2.29 [2.11;2.49]
After 6 months of treatment	1.86 [1.46;2.36]	0.46 [0.40;0.53]
After 12 months of treatment	1.70 [1.39;2.09]	0.44 [0.38;0.51]
After 24 months of treatment	2.09 [1.75;2.51]	0.66 [0.57;0.76]

INLEITUNG

Verwendungszweck

Der Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA ist ein enzymatimmunologischer Test zur Quantifizierung von Abbauprodukten C-terminaler Telopeptide des Typ-I Kollagens in menschlichem Urin.

Der Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA 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 Osteopenie:
 - a. Hormonersatztherapie (HRT) mit Hormonen und Pharmaka mit hormonartiger Wirkung
 - b. Biphosphonattherapie

B. Prognose der Knochen-Mineraldichte bei postmenopausalen Frauen unter antiresorptiver 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.

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 BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA wie beschrieben gemessen werden (2). Der Sandwich Test ist wie berichtet als geeignet zur Follow-up von anti-resorptiven Behandlung bei Patienten mit metabolischen Knochenerkrankungen geeignet (3-17).

Testprinzip

Der Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA basiert auf zwei hochspezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Aminosäuresequenz des EKAHD- β -GGR, in dem der Aspartatsäuretest (D) β -somerisiert ist. Um ein spezifisches Signal in dem Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA messen zu können, müssen zwei Ketten des EKAHD- β -GGR cross-linked werden.

Standard, Kontrollen und Urinproben werden in Microtiterwells pipettiert, die mit Streptavidin beschichtet sind. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Gemisches von biotinyliertem Antikörper und einem peroxidase-konjugiertem Antikörper. Der sich bildende Komplex zwischen CrossLaps Antigen, biotinyliertem Antikörper und peroxidase-konjugiertem Antikörper bindet sich an die Streptavidinoberfläche über den biotinylierten Antikörper. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur werden die Wells geleert und gewaschen. Ein chromogenes Substrat wird zugefügt und die Farbreaktion mit Schwefelsäure gestoppt. Zum Schluss wird 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.

Warnung

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

MATERIAL

Probengewinnung

Da der Knochenabbau einer deutlichen zirkadianen Varianz unterliegt, die v.a. durch Nahrungsaufnahme reguliert wird (18), wird empfohlen den zweiten Morgenurin nüchtern als Probenmaterial zu benutzen.

Die Urinproben gekühlt (2-8°C) für nicht mehr als eine Woche aufbewahren. Für längere Aufbewahrungen die Urinproben einfrieren (<-18°C). Es wird empfohlen, das Blut von nüchternen Patienten am Morgen zu entnehmen. Es sollte bitte berücksichtigt werden, dass zur optimalen Durchführung wird empfohlen die Proben vor dem Messen durchzumischen und sie dann zentrifugieren (z.B., 2000g; 10 min).

Beigefügtes Material

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

Streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten **MICROPLAT**

Mikrowellstreifen (12 x 8 Wells) vorbeschichtet mit Streptavidin. Beigefügt in einem Plastikrahmen.

CrossLaps Standard **CAL 0**

Ein Fläschchen (min. 10.0 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.

Kontrolle **CTRL 1 - 2**

Zwei Fläschchen (min. 0.4mL) CrossLaps Peptid in einer PBS-gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel. Die Kontrollmessbereiche sind auf den beigefügten Qualitätskontrollbericht zu entnehmen.

Biotinylierter Antikörper **Ab BIOTIN**

Ein Fläschchen (min. 0.25 mL) einer konzentrierten Lösung von biotinyliertem monoklonalen Mausantikörper spezifisch für Degradationsprodukte der C-terminalen Telopeptide vom Kollagen Typ-I. Zubereitet in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel.

Peroxidase-konjugierte Antikörper **ENZYMCNJ**

Ein Fläschchen (min. 0.25 mL) einer konzentrierten Lösung von peroxidase-konjugiertem monoklonalen Mausantikörper spezifisch für Degradationsprodukte der C-terminalen Telopeptide vom Kollagen Typ-I. Zubereitet in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel.

Inkubationspuffer **BUF**

Ein Fläschchen (min. 19 mL) gebrauchsfertiger gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren, Detergenzien und Konservierungsmittel.

Substratlösung **SUBS TMB**

Ein Fläschchen (min. 12 mL) gebrauchsfertiger Tertamethylbenzidine (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 50 x**

Ein Fläschchen (min. 20 mL) eines konzentrierten Waschpuffers mit Detergentien und Konservierungsmittel.

Klebestreifen

Adhesiver Film um die Wells während Inkubation zu bedecken.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Behälter zur Vorbereitung der Antikörperlösung und der Waschlösung
- Präzisionsmikropipetten für 10-200 µL
- Destilliertes Wasser
- Präzisionsmultikanalpipette (8- oder 12 Kanäle) für 100 µL und 150 µL
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Ausleser

TESTDURCHFÜHRUNG

Für die optimale Durchführung des Tests ist es wichtig die Instruktionen wie folgt zu befolgen. Vor dem Gebrauch alle Lösungen vorbereiten und bei Raumtemperatur equilibrieren lassen. Es wird empfohlen alle Proben in Duplikate zu messen. Zusätzlich werden in jedem Lauf insgesamt 16 Wells für die Standards und die Kontrollen benötigt. Die benötigte Anzahl von Teststreifen in den Plastikrahmen setzen. Nicht gebrauchte Immunistreifen in dem gut verschlossenen Tüte aufbewahren. Alle Reagenzien und Proben mischen vor dem Gebrauch (Schaumbildung vermeiden).

1 Vorbereitung der Antikörperlösung:

ACHTUNG: Die folgende Antikörperlösung maximal 30 Minuten vor Beginn der Testdurchführung ansetzen. Die biotinylierte Antikörper **Ab BIOTIN**, peroxidase-konjugierter Antikörper **ENZYMCONJ** und Inkubationspuffer **BUF** mit den Volumenverhältnissen 1+1+100 in einer leeren Schale mischen. Vorsichtig Mischen und Schaumbildung vermeiden. Eine frische Lösung vor jedem Benutzen des Tests ansetzen.

2 Verdünnen der Proben

Alles Material (unbekannte Proben und **CTRL 1 - 2**), mit Ausnahme der Standards in dem Kit müssen in dem Standard 0 1+3 vorverdünnt werden bevor dem Test (z.B. 20 µL+60 µL)

3 Inkubation

10 µL von unverdünntem Standard **CAL 0 - 5**, vorverdünnte Kontrollen und vorverdünnte unbekannt Probe in die dafür vorgesehenen Wells pipettieren gefolgt von 150 µL der Antikörperlösung. Die Immunistrips mit Klebestreifen bedecken und für 120±5 Minuten bei 18-22°C auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (300 rpm) inkubieren.

4 Waschen

Die Immunistrips 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 Waschschrte ausreichend. Nach jedem manuellen oder automatischen Waschschrte sicherstellen, dass die Wells vollständig geleert sind nach jedem manuellen oder automatischen Waschschrte.

5 Inkubation mit der chromogenen Lösung

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

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.

6 Stoppen der Farbreaktion

100 µL der Stopplösung **H2S04** in jedes Well pipettieren.

7 Absorption messen

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

Einschränkungen des Tests

Wenn die Absorption einer Probe der des Standard 5 übersteigt, sollte die Probe mit Standard 0 verdünnt und nochmals gemessen werden.

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 unbekannt Proben behandelt werden. Die Ergebnisse mit den appropriate statistischen Methoden analysieren.

ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes sollte die Quadratische Kurvenanpassung benutzt werden.

Alternativ, berechne den Durchschnitt der doppelt gemessenen Absorptionen. Konstruiere eine Standardkurve auf grafischem Papier durch das Auftragen der mittleren Absorption der sechs Standards (Ordinate) gegen die dazugehörigen CrossLaps Konzentrationen /Abszisse). Ermittle die CrossLaps der Kontrollen und von jeder Patientenprobe durch Interpolieren.

Beispiel von ermittelten Resultaten

Standards/ Kontrollen/ Proben	CrossLaps Konz. (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ Obs 1/ Obs 2 (nm)	Mittel-wert A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolierte CrossLaps konz. (µg/L)	Konz. korrigierte für 4X Verd. (µg/L)
Standard 0	0.00	0.046 / 0.045	0.046		
Standard 1	1.43	0.164 / 0.160	0.162		
Standard 2	4.24	0.402 / 0.383	0.393		
Standard 3	8.27	0.742 / 0.700	0.721		
Standard 4	16.6	1.461 / 1.366	1.414		
Standard 5	23.7	2.027 / 1.923	1.975		
Controllo 1		0.327 / 0.319	0.323	3.38	13.5
Controllo 2		1.216 / 1.173	1.195	14.0	55.9
Campione 1		0.162 / 0.150	0.156	1.36	5.44
Campione 2		0.507 / 0.500	0.504	5.56	22.2
Campione 3		1.173 / 1.082	1.128	13.2	52.6

Bitte beachten: Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden

Berechnen der korrigierten CrossLaps Werte

Für jede Probe sollte die CrossLaps Konzentration (ng/mL) und die Kreatininkonzentration ermittelt werden. Die Kreatininkonzentration in den Proben mittels einer standard enzymatisch kalorimetrischen Methode der klinischen Chemie ermitteln und die Korrektur durch die folgende Gleichung durchführen:

$$\text{Korr. CrossLaps Wert (mg/mmol)} = \frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Creatinine (mM)}}$$

Testcharakteristika

Nachweisgrenze: 0.80 µg/L CrossLaps

Dies entspricht der Konzentration von drei Standardabweichungen über dem Mittelwert von 21 Bestimmungen des Nullwertes („CrossLaps Standard 0“) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 4.

Präzision < 6.9%

Die Präzision des Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISAs wurde ermittelt von drei Urin Proben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen unten zusammengefasst (die Ergebnisse sind nicht durch den Verdünnungsfaktor korrigiert worden):

IntraAssay <3.9% (n=10)			InterAssay <6.9% (n=10)		
Mitte-lwert (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)	Mitte-lwert (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Verdünnung/Linearität

Der Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA ist linear im Bereich von 0.20 ng/mL zu 40.7 ng/mL.

Urinproben mit einer Konzentration von 16.7 – 52.8 ng/mL CrossLaps werden mit Standard 0 verdünnt und die Konzentration von CrossLaps werden mit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA bestimmt.

Die unten angegebenen Daten sind von 3 verschiedenen Durchläufen errechnet

Verdünnungsprozedur								
Urine [%]	Std. 0 [%]	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Wiederfindung (%)
		Erw. (µg/L)	WF (%)	Erw. (µg/L)	WF (%)	Erw. (µg/L)	WF (%)	
100	0	16.68	100	23.36	100	52.80	100	100
90	10	15.00	103	21.00	105	47.52	110	106
80	20	13.32	100	18.68	104	42.24	109	104
70	30	11.68	95	16.36	99	36.96	110	101
60	40	10.00	96	14.00	98	31.68	104	99
50	50	8.32	97	11.68	88	26.40	99	95
40	60	6.68	96	9.32	87	21.12	94	93
30	70	5.00	96	7.00	88	15.84	84	90
20	80	3.32	96	4.68	86	10.56	84	89
10	90	1.68	87	2.32	90	5.28	76	85
Mittelwert								96

WF: Wiederfindung, Erw: Erwartet

Interferenzen

Die Interferenz von Ditaurobilirubin, Hämoglobin und Intralipid auf die Messung von CrossLaps im Serum durch Serum CrossLaps® (CTX-I)ELISA wurde untersucht.

Bei den unten angegebenen Konzentrationen wurden keine Interferenzen festgestellt:

Ditaurobilirubin: 600 mg/L

Hämoglobin: 10 g/L

IntraLipid: 10 g/L

Erwartete Ergebnisse

Es ist empfehlenswert, für ein Labor seine eigenen Normwert- und pathologischen Bereiche zu etablieren.

Population	Anzahl Individuen (n)	Alter (Jahre)	Geometrischer Mittelwert (µg/mmoL)	95% CI
Prämenopausale Frauen	25	40-49	1.66	0.83-3.32
Postmenopausale Frauen	272	52-75	2.27	0.73-7.07
Männer	25	50-78	1.46	0.53-4.04

Tag-zu-Tag individuelle Variation

Die Tag-zu-Tag intraindividuelle Variation wurde ermittelt durch die Analyse von Urinproben (morgens, nüchtern) von 11 gesunde postmenopausalen Frauen zu fünf Zeitpunkten über 2 Wochen.

Indivuum	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA (µg/mmol)					Mittelwert (µg/ mmol)	SD (µg/mmol)	CV (%)
	Besuch 1	Besuch 2	Besuch 3	Besuch 4	Besuch 5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

Example Version

INTRODUZIONE

Uso del kit

Il kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA 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 BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA 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.

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.

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 BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA. I dosaggi con il kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA ha mostrato una elevata correlazione con i corrispondenti dosaggi eseguiti con il kit Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA. Quest'ultimo metodo si è dimostrato utile nel monitoraggio degli effetti della terapia anti riassorbimento osseo in pazienti con malattie metaboliche dell'osso (3 17).

Principio del metodo

Il metodo Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA è basato due anticorpi monoclonali altamente specifici per la sequenza aminoacidica EKAHD- β -GGR, dove il residuo di acido aspartico (D) è l'isomero β dell'aminoacido. Per ottenere un segnale specifico con il metodo Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA, due catene con la sequenza EKAHD- β -GGR devono essere legate tra loro.

Standard, controlli e campioni vengono pipettati in pozzetti di una micropiastre in cui è stata adsorbita streptavidina. Viene quindi aggiunta una soluzione contenente anticorpi biotinilati e anticorpi coniugati con perossidasi. Si forma un complesso sandwich tra gli antigeni CrossLaps® l'anticorpo biotinilato e l'anticorpo coniugato con perossidasi; questo complesso si lega alla streptavidina sulla fase solida per mezzo dell'anticorpo biotinilato. Al termine dell'incubazione si lava la micropiastre 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 BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA deve essere conservato a 2-8°C. In queste condizioni è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

MATERIALI

Raccolta dei campioni

Poiché il riassorbimento osseo presenta una marcata variazione circadiana, regolata principalmente dall'assunzione di alimenti (18), si consiglia di raccogliere le seconde urine del mattino senza assumere alimenti dalla cena precedente. Le

urine sono stabili fino ad una settimana a 2-8°C e a < -18°C per periodi più lunghi. Per ottenere risultati ottimali si consiglia di centrifugare i campioni prima del dosaggio a 2000g per 10 minuti.

Reattivi forniti

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

Micropiastra sensibilizzata con streptavidina **MICROPLAT**

Strip di pozzetti (12x8 pozzetti) sensibilizzati con streptavidina in un telaietto in plastica.

CrossLaps® Standard **CAL - 0**

Un flacone (min. 10,0 mL) contenente tampone fosfato pronto per l'uso con stabilizzante delle proteine e un conservante.

CrossLaps® Standard **CAL 1 - 5**

Cinque flaconi (min. 0,4mL/flacone) pronti per l'uso contenenti standard CrossLaps® in tampone fosfato con stabilizzante delle proteine e un conservante. Il valore esatto di ciascuno standard è stampato sul rapporto del controllo di qualità.

Controlli **CTRL 1 - 2**

Due flaconi (0,4mL/flacone) pronti per l'uso contenenti peptide CrossLaps® in tampone fosfato con stabilizzante delle proteine e un conservante. I valori di riferimento sono riportati sul foglio del controllo di rapporto del controllo di qualità.

Anticorpo biotinilato **Ab BIOTIN**

Un flacone (0,25 mL) di soluzione concentrata di un anticorpo monoclonale da topo, biotinilato, specifico per i prodotti di degradazione dei telopeptidi C terminali del collagene di tipo I, in soluzione tampone con stabilizzante delle proteine e un conservante.

Anticorpo coniugato con perossidasi **ENZYMCONJ**

Un flacone (0,25 mL) di soluzione concentrata di un anticorpo monoclonale da topo, coniugato con perossidasi, specifico per i prodotti di degradazione dei telopeptidi C terminali del collagene di tipo I, in soluzione tampone con stabilizzante delle proteine e un conservante.

Tampone di incubazione **BUF**

Un flacone (min. 19 mL) pronto per l'uso contenente una soluzione tampone con stabilizzante delle proteine, un detergente e un conservante.

Soluzione del substrato **SUBS TMB**

Un flacone (min. 12 mL) pronto per l'uso di substrato, tetrametilbenzidina (TMB) in tampone acido. Il substrato potrebbe avere un lieve colorazione blu.

Soluzione di stop **H2SO4**

Un flacone (min. 12 mL) pronto per l'uso di acido solforico 0,18 M.

Tampone di lavaggio **WASHBUF 50x**

Un flacone (min. 20 mL) di tampone di lavaggio concentrato con un detergente e un conservante.

Copripiastra adesivo

Film adesivo per coprire la micropiastra.

Materiale richiesto ma non fornito

- Vetreria per preparare la soluzione di lavoro dell'anticorpo e la soluzione di lavaggio.
- Micropipette di precisione per dispensare 10 200 µL.
- Acqua distillata.
- Multipipette di precisione a 8 canali per 100 µL e 150 µL.
- Agitatore per micropiastre.
- Lettore di micropiastre.

METODO DEL DOSAGGIO

Per 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 16 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. Prima dell'uso agitare tutti i reattivi. Evitare la formazione di schiuma.

1. Preparazione della soluzione anticorpale:

ATTENZIONE: Preparare la soluzione anticorpale non oltre 30 min. prima di iniziare il dosaggio. Aggiungere in un contenitore vuoto il contenuto dei anticorpo biotinilato **Ab BIOTIN**, anticorpo coniugato con perossidasi **ENZYMCONJ** e tampone di incubazione **BUF** in rapporto volumetrico 1+1+100. Mescolare con cura evitando la formazione di schiuma. Preparare una soluzione fresca ogni volta che si esegue un dosaggio.

2. Pre-diluizione dei campioni

I campioni e i controlli **CTRL 1 - 2**, tranne gli standard contenuti nel kit devono essere pre-diluiti con standard 0 prima del dosaggio (ad es. 20 µL + 60 µL).

3. Incubazione One Step

Pipettare 10 µL di Standard non diluiti **CAL 0 - 5**, Controlli pre-diluiti, e campioni pre-diluiti nei rispettivi pozzetti.

Pipettare 150 µL di soluzione anticorpale. Coprire con il copripiastra adesivo e incubare 120±5 minuti a temperatura ambiente (18-22°C) su un agitatore rotante per micropiastre (300 rpm).

4. Lavaggio

Lavare 5 volte le strisce con 300 µL tampone di lavaggio (**WASHBUF 50x** diluito 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.

5. 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 copripiastra 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.

6. Arresto della reazione

Pipettare 100 µL di soluzione di stop **H2S04** in tutti i pozzetti.

7. Misura dell'assorbanza

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

Limiti del metodo

Diluire ulteriormente con Standard 0 e ridosare i campioni che presentano un'assorbanza superiore a quella dello Standard 5.

CONTROLLO DI QUALITA'

La "Good Laboratory Practice" (GLP) richiede che vengano inseriti in ogni esperimento dei controlli 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

Utilizzare la regressione quadratica per elaborare i dati.

In alternativa, calcolare la media delle assorbanze dei duplicati e costruire una curva standard, 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.

Esempio dei risultati ottenuti:

Standard/ Controlli/ campioni	CrossLaps konc. (µg/l)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	Mean A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolerad CrossLaps konc. (µg/l)	Conc. corretta per la diluizione 4X (µg/l)
Standard 0	0,00	0,046 / 0,045	0,046		
Standard 1	1,43	0,164 / 0,160	0,162		
Standard 2	4,24	0,402 / 0,383	0,393		
Standard 3	8,27	0,742 / 0,700	0,721		
Standard 4	16,6	1,461 / 1,366	1,414		
Standard 5	23,7	2,027 / 1,923	1,975		
Controllo 1		0,327 / 0,319	0,323	3,38	13,5
Controllo 2		1,216 / 1,173	1,195	14,0	55,9
Campione I		0,162 / 0,150	0,156	1,36	5,44
Campione II		0,507 / 0,500	0,504	5,56	22,2
Campione III		1,173/ 1,082	1,128	13,2	52,6

Nota: I dati sopra riportati sono forniti a titolo di esempio 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® (ng/mL) e di creatinina (mmol/L). Per la determinazione della creatinina usare un metodo enzimatico colorimetrico; eseguire la correzione utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Valore corretto CrossLaps } (\mu\text{g/mmol}) = \frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Creatinine (mM)}}$$

Caratteristiche del metodo

Concentrazione minima rilevabile: 0,80 µg/L di CrossLaps®

La concentrazione minima rilevabile è la concentrazione di CrossLaps® corrispondente a tre DS oltre la media delle assorbanze di 21 determinazioni dello standard zero ("CrossLaps® Standard 0") moltiplicata per il fattore di diluizione 4.

Precisione < 6.9%

La precisione del kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA è stata valutata dosando tre campioni di urine. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente (i risultati non sono stati corretti per il fattore di diluizione)

Intra saggio <3.9% (n=20)			Inter saggio <6.9% (n=10)		
Media (µg/l)	DS (µg/l)	CV (%)	Media (µg/l)	DS (µg/l)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Diluizione/Linearità

Il kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA è lineare nell'intervallo compreso tra 0,20 ng/mL e 40,7 ng/mL di CrossLaps®.

Campioni di urine con concentrazioni di CrossLaps® comprese tra 16,7 e 52,8 ng/mL sono stati diluiti con lo standard 0;

Le concentrazioni di CrossLaps® sono state determinate con il kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA.

I dati sotto riportati sono stati ottenuti diluendo tre campioni differenti di urine:

Test di diluizione								
Urin [%]	Std. 0 [%]	Campione 1		Campione 2		Campione 3		Recupero medio (%)
		Att (µg/L)	Rec (%)	Att. (µg/L)	Rec (%)	Att. (µg/L)	Rec (%)	
100	0	16.68	100	23.36	100	52.80	100	100
90	10	15.00	103	21.00	105	47.52	110	106
80	20	13.32	100	18.68	104	42.24	109	104
70	30	11.68	95	16.36	99	36.96	110	101
60	40	10.00	96	14.00	98	31.68	104	99
50	50	8.32	97	11.68	88	26.40	99	95
40	60	6.68	96	9.32	87	21.12	94	93
30	70	5.00	96	7.00	88	15.84	84	90
20	80	3.32	96	4.68	86	10.56	84	89
10	90	1.68	87	2.32	90	5.28	76	85
Media								96

Rec: Recuperato, Att: atteso

Valori attesi

Ogni laboratorio deve stabilire propri intervalli di riferimento per soggetti normali e patologici

Popolazione	Numero di soggetti (n)	Età (anni)	Media geometrica (µg/mmol)	IC 95%
Donne in post-menopausa	25	40-49	1,66	0.83-3.32
Donne in pre-menopausa	272	52-75	2,27	0.73-7.07
Uomini	25	50-78	1,46	0.53-4.04

Variatione giornaliera individuale

La variazione giornaliera individuale è stata valutata analizzando campioni di urine del mattino raccolte a digiuno di 11 donne in post menopausa 5 volte nell'arco di 2 settimane.

Soggetto	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA (µg/mmol)					Media (µg/mmol)	SD (µg/mmol)	CV (%)
	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

INTRODUÇÃO

Utilização proposta

O Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA é uma teste imunológico de enzima para a quantificação de produtos de degradação de telopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo-I em urina humana.

O ensaio com o Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA 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 (TRH) com hormônios e medicamentos que atuam como hormônios.
 - b) Terapias com bifosfonato.

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

- a) Terapias de Reposição Hormonal (TRH) 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.

Resumo e explicação do teste

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 do Tipo-I é degradado e pequenos fragmentos de peptídeos são expelidos na urina. Estes fragmentos podem ser mensurados pelo Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA. O Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA demonstra uma alta correlação com correspondente medida das amostras de soro no Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA. O Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA tem sido apontado como sendo útil para acompanhamento do tratamento anti-reabsorção de pacientes com doenças ósseas metabólicas (3-17).

Princípios do procedimento

O Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA é baseado em dois anticorpos monoclonais altamente específicos contra a seqüência de aminoácido EKAHD- β -GGR, onde o resíduo do ácido aspártico (D) é β -isomerizado. Para obter um sinal específico no Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA, duas cadeias de EKAHD- β -GGR devem estar apresentando ligações cruzadas.

Os padrões, o controle ou as amostras de urina são pipetadas nas cavidades de microtitulação adequadas, revestidas com streptavidina, seguido pela aplicação de uma mistura de um anticorpo biotilado e de um anticorpo conjugado com peroxidase. Então é gerado um complexo entre os antígenos CrossLaps, o anticorpo biotilado e o anticorpo conjugado com peroxidase, que adere à superfície da streptavidina através do anticorpo biotilado. Após a incubação de etapa única a temperatura ambiente, as cavidades são esvaziadas e lavadas. Um substrato cromogênico é adicionado e a reação de cor é interrompida com ácido sulfúrico. Finalmente, a absorvância é medida.

PRECAUÇÕES

As precauções a seguir devem ser observadas no laboratório:

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

Avisos

Apenas para utilização *in vitro*.

- Todos os reagentes e equipamentos do laboratório devem ser manuseados e descartados como se fossem material infeccioso.
- Não utilize componentes do kit após a data de vencimento e não misture reagentes de lotes diferentes.

Armazenamento

Armazene o kit Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA após o recebimento a 2-8°C. Sob estas condições, o kit permanente estável até a data de vencimento marcada na embalagem.

MATERIAIS

Coleta da amostra

Como a reabsorção óssea tem uma marcante variação circadiana primariamente regulada pela ingestão de alimentos (18), é recomendado que seja utilizado o segundo jato de urina da manhã após uma noite de jejum.

Mantenha a amostra de urina refrigerada (2-8°C) para estoque por menos do que uma semana, ou congele a amostra (<-18°C) para longa estocagem. Observe que para otimizar resultados é recomendado que se misture as amostras, e então que as mesmas sejam centrifugadas (p.ex. 2000g; 10 min) antes de testá-las.

Materiais fornecidos

Antes de abrir o kit, realize a leitura da seção **Precauções**. O kit contém reagentes suficientes para 96 determinações.

Placa de microtitulação revestida com streptavidina **MICROPLAT**

Tiras com microcavidades (12x8 wells) pre-revestidas com streptavidina. Fornecidas em um suporte plástico.

Padrão CrossLaps **CAL 0**

Um frasco (min. 10.0 mL/vial) de solução tamponada com PBS, pronta para uso, com estabilizador de proteína e conservante.

Padrão CrossLaps **CAL 1-5**

Cinco frascos (min. 0.4mL/vial) de solução tamponada PBS, padrão CrossLaps, pronta para uso, contendo estabilizador de proteína e conservante. O valor exacto de cada Padrão encontra-se impresso no relatório do controlo da qualidade.

Controles **CTRL 1 - 2**

Dois frascos (min. 0.4mL/vial) CrossLaps peptídeo em solução tamponada PBS contendo estabilizador de proteína e conservante. Favor verificar a folha relatório do controlo da qualidade para aferir controle de alcance.

Anticorpo Biotinilado **Ab BIOTIN**

Um frasco (min. 0.25 mL) de solução concentrada contendo um anticorpo monoclonal biotilado específico para produtos de degradação de telopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo-I, Preparado numa solução tamponada contendo estabilizador de proteína e conservante.

Anticorpo Conjugado Peroxidase **ENZYMCONJ**

Um frasco (min. 0.25 mL) de solução concentrada de anticorpo monoclonal de conjugado peroxidase específico para produtos de degradação de telopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo-I. Preparado numa solução tamponada com estabilizador de proteína e conservante.

Tampão para incubação **BUF**

Um frasco (min. 19 mL) de solução tampão, pronta para uso, com 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 um tampão ácido. Favor observar que o substrato cromogênico poderá ter aparência um pouco azulada.

Solução Stop **H2S04**

Um frasco (min. 12 mL) de ácido sulfúrico 0.18 mol/L, pronto para o uso.

Tampão para lavagem **WASHBUF 50x**

Um frasco (min. 20 mL) de tampão concentrado para lavagem, com detergente e conservante.

Fita selante

Fita adesiva para cobrir as cavidades durante a incubação.

Materiais necessários – não fornecidos

- Recipientes para preparação da Solução de Anticorpo e da Solução para Lavagem
- Micropipetas de precisão para dispensar 10-200 µL
- Água destilada
- Multipipeta de precisão com 8 ou 12 canais para dispensar 100 µL and 150 µL

- Equipamento de agitação de microcavidades
- Leitor de placa de microtitulação

PROCEDIMENTO PARA O ENSAIO

Procedimento para o Ensaio

Para a otimização da performance do ensaio, é importante que se observe as instruções que seguem abaixo. Equilibrar todos os reagentes à temperatura da sala (18-22°C) antes do uso. Determine o número de tiras necessárias para o ensaio. É recomendado o teste de todas as amostras em duplicata. Além disso, para cada teste, um total de 16 cavidades são necessárias para padrões e controles Coloque o apropriado número de tiras no apoio plástico. Deposite as imunotiras não utilizadas na embalagem hermeticamente fechada juntamente com as cápsulas dessecantes. Misture todos os reagentes e amostras antes do uso (evite espuma).

1 Preparação da Solução de Anticorpo:

ATENÇÃO: Prepare a **Solução de Anticorpo** no máximo **30 minutos** antes de iniciar o ensaio. Misture as Anticorpo Biotinilado **Ab BIOTIN**, Anticorpo Conjugado Peroxidase **ENZYMCONJ** e Tampão para Incubação **BUF** na proporção volumétrica 1+1+100 num recipiente vazio. Misture cuidadosamente e evite a formação de espuma. **Prepare uma nova solução antes de cada teste.**

2 Pre-diluição das amostras em teste

Todas as amostras (amostras desconhecidas e **CTRL 1 - 2**), exceto os padrões entregues com o kit, devem ser pre-diluídos 1+3 no padrão 0 antes do teste (p.ex. 20 µL+60 µL).

3 Incubação de uma etapa

Pipete 10 µL de **Padrões** não-diluídos **CAL 0 - 5**, **Controles** pre-diluídos e amostras desconhecidas pre-diluídas nas cavidades adequadas e mais 150 µL de **Solução de Anticorpo**. Cubra as imunotiras com fita selante e incube por 120±5 minutos a temperatura ambiente (18-22°C) em um equipamento de agitação de placa de microtitulação (300 rpm).

4 Lavagem

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

5 Incubação com solução de substrato cromogênico

Pipete 100 µL de Solução de Substrato **SUBS TIME** em cada cavidade e incube por 15±2 minutos a temperatura ambiente (18-22°C), no escuro, com equipamento de agitação (300 rpm). Utilize a fita selante. 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.

6 Interrompendo a reação de desenvolvimento de cor

Pipete 100 µL de **Solução Stop** **H2S04** em cada cavidade.

7 Medição da Absorbância

Realize a medição de absorbância em 450 nm, utilizando 650 nm como referência, em no máximo 2 horas.

Limitações do procedimento

Se a absorbância de uma amostra exceder aquela do **Padrão 5**, a amostra deve ser diluída no **Padrão 0**, e posteriormente reanalisada.

CONTROLE DE QUALIDADE

A Boa Prática Laboratorial (GLP) exige a utilização 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

Cálculos dos resultados

Uma curva quadrática deve ser usada.

Alternativamente, calcule a média das determinações de absorbância em duplicata. Construa uma curva padrão em um

papel gráfico, posicionando as absorvâncias médias corrigidas dos seis padrões (ordenada) contra as concentrações correspondentes de CrossLaps (abscissa). Determine a concentração de CrossLaps dos controles e de cada amostra dos pacientes por interpolação.

Exemplos de resultados obtido

Padrões/ Controles/ Amostras	Conc. de CrossLaps (µg/L)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	Média A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolado Conc. de CrossLaps (µg/L)	Conc. Corrigido para diluição 4X (µg/L)
Padrão 0	0.00	0.046 / 0.045	0.046		
Padrão 1	1.43	0.164 / 0.160	0.162		
Padrão 2	4.24	0.402 / 0.383	0.393		
Padrão 3	8.27	0.742 / 0.700	0.721		
Padrão 4	16.6	1.461 / 1.366	1.414		
Padrão 5	23.7	2.027 / 1.923	1.975		
Controle 1		0.327 / 0.319	0.323	3.38	13.5
Controle 2		1.216 / 1.173	1.195	14.0	55.9
Amostra I		0.162 / 0.150	0.156	1.36	5.44
Amostra II		0.507 / 0.500	0.504	5.56	22.2
Amostra III		1.173/ 1.082	1.128	13.2	52.6

Observação:

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

Cálculo do valor CrossLaps corrigido

Para cada amostra, a concentração de CrossLaps (ng/mL) e a concentração de creatinina (mmol/L) devem ser determinadas. Determine a concentração de creatinina (mmol/L) na amostra usando uma rotina de método colorimétrico enzimático para analisadores químico-clínicos, e faça a correção usando a equação:

$$\text{Correção do valor CrossLaps } (\mu\text{g/mmol}) = \frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Creatinine (mM)}}$$

Características da performance

Limite de detecção: 0.80 µg/L CrossLaps

Esta é a concentração correspondente a três desvios padrões acima da média de 21 determinações do branco ("CrossLaps Padrão 0") multiplicada pelo fator de diluição 4.

Precisão ≤ 6.9%

A precisão do Urine BETA CrossLaps® (CTX-I)ELISA foi avaliada para três amostras de urina. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo (os resultados não foram corrigidos por fator de diluição).

Intra-ensaio ≤ 3.9% (n=10)			Inter-ensaio ≤ 6.9% (n=10)		
Média (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)	Média (µg/L)	SD (µg/L)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Diluição/Linearidade

O Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA é linear na faixa de 0.20 ng/mL a 40.7 ng/mL de CrossLaps.

Amostras de urina com a concentração de 16.7 – 52.8 ng/mL CrossLaps foram diluídas com o padrão 0 e a concentração de CrossLaps foi determinada com o Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA.

Os dados abaixo estão calculados a partir de 3 ensaios diferentes

Procedimento de Diluição								
Urina [%]	Padrão 0 [%]	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Recuperação Total (%)
		Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	
100	0	16.68	100	23.36	100	52.80	100	100
90	10	15.00	103	21.00	105	47.52	110	106
80	20	13.32	100	18.68	104	42.24	109	104
70	30	11.68	95	16.36	99	36.96	110	101
60	40	10.00	96	14.00	98	31.68	104	99
50	50	8.32	97	11.68	88	26.40	99	95
40	60	6.68	96	9.32	87	21.12	94	93
30	70	5.00	96	7.00	88	15.84	84	90
20	80	3.32	96	4.68	86	10.56	84	89
10	90	1.68	87	2.32	90	5.28	76	85
Mean								96

RC: Recuperação, Exp: Esperado

Valores esperados

É aconselhável que um laboratório estabeleça sua própria faixa de valores normais e patológicos.

População	Número de sujeitos (n)	Idade (anos)	Valores Médios Geométricos (µg/mmol)	95% CI
Mulheres antes da menopausa	25	40-49	1.66	0.83-3.32
Mulheres após a menopausa	272	52-75	2.27	0.73-7.07
Homens	25	50-78	1.46	0.53-4.04

Varição Individual Dia a Dia

A Variação Intra-Individual Dia a Dia foi avaliada através de análises de amostras de urina (manhã, em jejum) de 11 mulheres saudáveis, após menopausa, em cinco pontos ao longo de 2 semanas

Sujeito No	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA (µg/mmol)					Média (µg/mmol)	D. Padrão (µg/mmol)	CV (%)
	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

INTRODUKTION

Anbefalet anvendelse

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA er et enzym-baseret immunoassay for kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter af C-terminalt telopeptid fra type I kollagen i human urin.

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA er kun til in vitro diagnostisk brug som en indikator for knogle nedbrydning og kan bruges som en hjælp ved:

A. Monitorering af ændringer i knoglenedbrydningen ved

1. Anti-resorptiv behandling af postmenopausale kvinder med:

- a. Hormoner og hormon-lignende stoffer
- b. Bisphosphonater

B. Forudsigelse af skeletalt respons (knogle mineral densitet) i postmenopausale kvinder i anti-resorptiv behandling med:

- a. Hormoner og hormon-lignende stoffer
- b. Bisphosphonater

Begrænsninger

Brug af testen til forudsigelse af udviklingen af osteoporose eller fremtidig fraktur risiko er ikke etableret.

Sammendrag

Type I kollagen udgør mere end 90% af den organiske matrix i knogler og produceres primært i knogle. Under fornyelse af knoglevæv nedbrydes type I kollagen og små kollagen fragmenter udskilles til urin. Disse fragmenter kan måles med Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA. Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA viser en stærk korrelation med tilsvarende målinger med Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA. Serum CrossLaps® ELISA blev beskrevet som anvendelig ved opfølgning af anti-resorptiv behandling af patienter med metaboliske knoglesygdomme (3-17).

Test procedure, kortfattet

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA bygger på to, højt specifikke monoclonale antistoffer rettet mod aminosyre sekvensen EKAHD-b-GGR, hvor asparaginsyre (D) er isomeriseret. For at få et specifikt signal i Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA kræves der to krydsbundne EKAHD-b-GGR kæder.

Standarder, kontroller og urinprøver pipetteres i mikrotiterbrønde, der er dækket med streptavidin, hvorefter der tilsættes en blanding af det biotinylerede og det peroxidase-mærkede antistof. Et kompleks dannes mellem CrossLaps antigenet, det biotinylerede antistof og det peroxidase-mærkede antistof, og dette kompleks binder sig til streptavidin-overfladen via det biotinylerede antistof. Efter inkubation ved stuetemperatur, tømmes brøndene og de vaskes. Et farve substrat tilsættes og farve reaktionen stoppes med svovlsyre. Til sidst måles absorbansen.

FORHOLDSREGLER

Følgende forholdsregler bør iagttages ved arbejde i laboratorier:

- Der må ikke spises, drikkes eller påføres kosmetik, hvor immundiagnostiske reagenser håndteres.
- Der må ikke pipetteres med munden.
- Anvend handsker ved håndtering af immundiagnostiske reagenser og vask hænderne grundigt bagefter.
- Afdæk arbejdspladsen med absorberende papir.

Advarsler

Kittet er kun til brug in vitro.

- Alle reagenser og laboratorieudstyr bør håndteres og bortskaffes som var de infektiøse.
- Anvend ikke kit reagenser efter udløbs datoen og bland aldrig reagenser fra forskellige lots.

Opbevaring

Opbevar Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA kittet ved 2-8°C efter modtagelsen. Ved denne temperatur er kittet holdbart og kan anvendes indtil udløbs datoen, der er angivet på æsken.

MATERIALER

Prøve opsamling

Eftersom knoglenedbrydning er følsom over for døgnvariation, primært reguleret af madintagelse (18), anbefales det at opsamle prøver fra anden morgenurinprøve efter faste.

Opbevar urinprøverne ved (2-8°C) i op til en uge. Ved længere opbevaring bør prøverne fryses (<-18 °C). For optimale resultater anbefales det at prøverne mixes og derefter centrifugere dem (e.g. 2000g; 10 min) inden anvendelse.

Medfølgende materialer

Før kittet tages i brug bør afsnittet Forholdsregler læses. Kittet indeholder tilstrækkelig reagenser til 96 bestemmelser.

Streptavidin dækkede mikrotiter plader MICROPLAT

Mikrobrønde (12 x 8 brønde) overfladebehandlet med streptavidin. Leveres i en plastik ramme.

CrossLaps Standard CAL 0

En flaske (min. 10.0 mL) med klar-til-brug CrossLaps buffer med stabilisator og konserveringsmiddel.

CrossLaps Standarder CAL 1- 5

Fem flasker (min. 0.4mL pr. flaske) med klar-til-brug CrossLaps standard i buffer med stabilisator og konserveringsmiddel. Den eksakte værdi på hver standard er trykt på Kvalitetskontrolrapport.

Kontrol CTRL 1 - 2

To flasker med (min. 0.4mL) CrossLaps peptid i buffer med stabilisator og konserveringsmiddel. Koncentrationen af CrossLaps i kontrollen er angivet på medfølgende Kvalitetskontrolrapport.

Biotinyleret Antistof Ab BIOTIN

En flaske (min. 0.25 mL) med en koncentreret opløsning af et biotinyleret, murint monoklonalt antistof, der er specifikt for nedbrydningsprodukter fra C-terminalt telopeptid fra type I kollagen. Opløsningen er en buffer med stabilisator og konserveringsmiddel.

Peroxidase Konjugeret Antistof ENZYMCNJ

En flaske (min. 0.25 mL) med en koncentreret opløsning af et peroxidase-mærket, murint monoklonalt antistof, der er specifikt for nedbrydningsprodukter fra C-terminalt telopeptid fra type I kollagen. Opløsningen er en buffer med stabilisator og konserveringsmiddel.

Inkubations Buffer BUF

En flaske (min. 19 mL) med en klar-til-brug buffer indeholdende stabilisator, detergent og konserveringsmiddel.

Substrat Opløsning SUBS TMB

En flaske (min. 12 mL) med en klar-til-brug sur buffer indeholdende tetramethylbenzidin (TMB). Substrat opløsningen kan forekomme let blålig.

Stop Opløsning H2S04

En flaske (min. 12 mL) med en klar-til-brug 0.18 mol/L svovlsyre.

Vaske Opløsning WASHBUF 50x

En flaske (min. 20 mL) med en koncentreret buffer indeholdende detergent og konserveringsmiddel.

Nødvendige materialer – ikke medfølgende

- Beholdere til at fremstille Antistof Opløsning og Vaske Opløsning
- Mikropipetter til at afpipettere 10-200 µL
- Destilleret vand.
- 8- eller 12-kanals multipipetter til at afpipettere 100 µL og 150 µL.
- Mikrotiter plade ryster
- Mikrotiter plade læser

TEST PROCEDURE**Test procedure**

For en optimal udførelse af testen er det vigtigt at følge nedenstående instruktion. Lad alle reagenser opnå stuetemperatur (18-22°C) inden anvendelse. Afgør hvor mange strips det er nødvendigt at benytte til testen. Det anbefales at udføre alle tests som dobbeltbestemmelser. Yderligere benyttes i alt 16 brønde til standarder og kit-kontroller for hver analyse kørsel. Placer det ønskede antal immunostrips i plastik rammen. Mix alle reagenser og prøver inden brug, idet skumdannelse dog bør undgås.

1. Fremstilling af Antistof Opløsning

BEMÆRK: Antistof Opløsningen skal fremstilles maksimalt 30 minutter før tilsætning til brøndene. Bland Biotinyleret Antistof Ab BIOTIN , Peroxidase Konjugeret Antistof ENZYMCNJ og Inkubations Buffer BUF i forholdet 1+1+100 i en tom beholder. Bland omhyggeligt, idet skumdannelse bør undgås. Fremstil en frisk Antistof Opløsning

før hver brug i testen.

2. For-fortynding af prøver

Alle prøver (også kit kontroller **CTRL 1 - 2**), undtagen de standarder leveret med kittet, skal fortyndes 1+3 i standarden 0 inden anvendelse (f.ex. 20 µl + 60 µl).

3. Inkubation med Antistof Opløsning

Pipette 10 µl af for-fortyndede Standarder **CAL 0 - 5**, for-fortyndede Kontroller, og for-fortyndede ukendte prøver i de respektive brønde efterfulgt af 150 µl Antistof Opløsning. Tildæk brøndene med forseglningstape og inkuber i 120+5 minutter ved stuetemperatur (18-22°C) på en mikrotiter plade ryster (300 rpm).

4. Vask

Vask brøndene 5 gange manuelt med 300 µL Vaske Opløsning (**WASHBUF 50x** fortyndet 1+50 i destilleret vand). Ved brug af automatisk vasker bør fabrikantens eller laboratoriets egne instruktioner følges. Sædvanligvis er 5 gange vask nok. Ved både manuel og automatisk vask er det meget vigtigt at brøndene tømmes fuldstændigt efter hver vask.

5. Inkubation med Substrat Opløsning

Pipetter 100 µL af Substrat Opløsningen **SUBS TIME** i hver brønd og inkuber 15+2 minutter ved stuetemperatur (18-22°C) i mørke på mikrotiter plade rysteren (300 rpm). Brug forseglningstape. Pipetter ikke direkte fra flasken med Substrat Opløsning, men overfør det nødvendige volume af væsken til en ren beholder. Overskydende Substrat Opløsning i beholderen bør bortskaffes og ikke hældes tilbage i flaske.

6. Stop af farve reaktion

Pipetter 100 µL af Stop Opløsning **H2S04** i hver brønd.

7. Måling af absorbans

Absorbansen ved 450 nm, med 650 nm som reference, måles indenfor to timer.

Begrænsninger ved proceduren

Hvis absorbansen i en brønd overstiger absorbansen for Standard 5, bør prøven fortyndes i Standard 0 og måles igen.

KVALITETSKONTROL

"Good Laboratory Practice" (GLP) foreskriver brugen af kontrol prøver i hver analyse for at verificere at analysen er indenfor specifikationerne. Kontroller bør håndteres som ukendte prøver og resultaterne bør analyseres med egnede statistiske metoder.

RESULTATER

Beregning af resultater

Kvadratisk kurve fit kan bruges.

Alternativt kan middelværdien af absorbans dobbeltbestemmelserne udregnes. En standardkurve konstrueres ved at afbilde absorbans middelværdierne af Standard (ordinat) mod den korresponderende CrossLaps® koncentration (abscisse). CrossLaps® koncentrationen i kontroller og ukendte prøver bestemmes herefter ved at aflæsning på standard kurven.

Eksempel på beregning af resultater:

Standarder/ kontroller/ prøver	CrossLaps konc. (µg/l)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	Mean A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolerad CrossLaps konc. (µg/l)	Konc. korr. for 4X fortynding (µg/l)
Standard 0	0,00	0,046 / 0,045	0,046		
Standard 1	1,43	0,164 / 0,160	0,162		
Standard 2	4,24	0,402 / 0,383	0,393		
Standard 3	8,27	0,742 / 0,700	0,721		
Standard 4	16,6	1,461 / 1,366	1,414		
Standard 5	23,7	2,027 / 1,923	1,975		
Kontroll 1		0,327 / 0,319	0,323	3,38	13,5
Kontroll 2		1,216 / 1,173	1,195	14,0	55,9
Prøve I		0,162 / 0,150	0,156	1,36	5,44
Prøve II		0,507 / 0,500	0,504	5,56	22,2
Prøve III		1,173/ 1,082	1,128	13,2	52,6

Bemærk: Tallene ovenfor er kun for illustration og må ikke anvendes ved beregning af resultater fra analyser.

Beregning af korrigeret CrossLaps værdi

Til hver prøve skal koncentrationen af CrossLaps (ng/mL) og kreatinin koncentration (mM=mmol/L) bestemmes. Sidstnævnte kan bestemmes ved hjælp af en enzymatisk kolometrisk metode ved anvendelse af kliniske kemiske analyseapparater. Anvend følgende ligning til at beregne den korrigerede værdi:

$$\text{Korrigeret CrossLaps værdi } (\mu\text{g}/\text{mmol}) = \frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Kreatinin (mM)}}$$

Test specifikationer

Detektionsgrænse: 0,80 $\mu\text{g}/\text{L}$ CrossLaps

Detektionsgrænsen er den koncentration, der svarer til tre standardafvigelser beregnet på basis af 21 bestemmelser af standard 0 (gange med fortyndingsfaktoren 4).

Præcision $\leq 6.9\%$

Præcisionen af Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA blev evalueret ved hjælp af tre urinprøver. Resultaterne er vist nedenfor (resultaterne er ikke korrigeret med fortyndingsfaktor)

Intraassay $\leq 3.9\%$ (n=10)			Interassay $\leq 6.9\%$ (n=10)		
Gennemsnit ($\mu\text{g}/\text{l}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{l}$)	CV (%)	Gennemsnit ($\mu\text{g}/\text{l}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{l}$)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Linearitet

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA er lineær i området 0.20 ng/mL til 40.7 ng/mL af CrossLaps.

Urinprøver med koncentrationen på 16.7 –52.8 ng/mL CrossLaps blev fortyndet med Standard 0 og koncentrationen blev efterfølgende målt i Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA.

Tallene nedunder blev beregnet fra 3 forskellige urinprøve

Fortyndinger								
Urin [%]	Std. 0 [%]	Prøve 1		Prøve 2		Prøve 3		Overall recovery (%)
		Exp. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RC (%)	Exp. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RC (%)	Exp. ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RC (%)	
100	0	16.68	100	23.36	100	52.80	100	100
90	10	15.00	103	21.00	105	47.52	110	106
80	20	13.32	100	18.68	104	42.24	109	104
70	30	11.68	95	16.36	99	36.96	110	101
60	40	10.00	96	14.00	98	31.68	104	99
50	50	8.32	97	11.68	88	26.40	99	95
40	60	6.68	96	9.32	87	21.12	94	93
30	70	5.00	96	7.00	88	15.84	84	90
20	80	3.32	96	4.68	86	10.56	84	89
10	90	1.68	87	2.32	90	5.28	76	85
Mean								96

RC: Recovery, Exp: Expected

Reference værdier

Det anbefales at laboratorier selv etablerer normale og patologiske reference værdier

Population	Antal individer (n)	Ålder (År)	Geometriskt Gennemsnit (µg/mmol)	95% CI
Pre-menopausal kvinder	25	40-49	1,66	0.83-3.32
Post-menopausal kvinder	272	52-75	2,27	0.73-7.07
Mænd	25	50-78	1,46	0.53-4.04

Dag-til-dag individuel variation

Den intra-individuelle variation blev undersøgt ved analyse af fem urinprøver opsamlet efter morgenfaste hos hver 11 raske postmenopausal kvinder over 2 uger.

Individ nr	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA (µg/mmol) per besøg					Mean (µg/mmol)	SD (µg/mmol)	CV (%)
	1	2	3	4	5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

INTRODUKTION

Användningsområde

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA är en enzymimmunologisk metod för kvantifiering av nedbrytningsprodukter av C-terminal telopeptider av typ I kollagen i human urin. Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA analysen är avsedd för *in vitro* diagnostisk användning som en indikation på human benresorption och kan användas som ett hjälpmedel vid:

A. Monitorering av förändringar av benresorption i samband med

1. Antiresorptiva behandlingar av postmenopausala kvinnor:
 - a. Hormonersättningsterapier (HRT) med hormoner och hormonlika läkemedel
 - b. Bisfosfonatbehandlingar

B. Prognostisering av skelettorespons (bentäthet) i postmenopausala kvinnor som undergår antiresorptiv behandling

- a. Hormonersättningsterapier (HRT) med hormoner och hormonlika läkemedel
- b. Bisfosfonatbehandlingar

Limitations

Användning av analysen har inte etablerats för prognos av osteoporos eller framtida frakturnrisk.

Sammanfattning och förklaring av test

Kollagen typ I svarar för mer än 90% av den organiska benmatrisen och syntetiseras främst i ben (1). Under förnyelse av skelettet, bryts kollagen typ I ned och små peptidfragment utsöndras i blodomloppet. Dessa fragment kan mätas med Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA. Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA uppvisar en stark korrelation med motsvarande mätningar med Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA som har beskrivits som användbar för uppföljning av antiresorptiv behandling av patienter med metaboliska bensjukdomar (3-17).

Testprinciper

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA är baserat på två höggradigt specifika monoklonala antikroppar mot aminosyresekvensen EKAHD-β-GGR, där *asparbinsyraregionen* (D) är β-isomerisad. För att erhålla en specifik signal i Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA måste två kedjor av EKAHD-β-GGR vara korslänkade.

Standarder, kontroll och okända serumprover pipetteras i därför avsedda brunnar på mikrotiterplattans som är förbehandlad med streptavidin. Sedan tillförs en blandning av biotinylerad antikropp och en peroxidaskonjugerad antikropp. Då bildas ett komplex mellan CrossLaps antigener, biotinylerad antikropp och peroxidaskonjugerad antikropp vilket binder till den streptavidintäckta ytan via den biotinylerade antikroppen. Efter enstegs inkubationen vid rumstemperatur töms brunnarna och tvättas. Ett kromogent substrat tillförs och färgreaktionen stoppas med svavelsyra. Avslutningsvis mäts absorbansen.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Följande försiktighetsåtgärder bör vidtas i laboratoriet:

- Undvik intagande av föda och dryck, rökning eller påtagning av smink där immundiagnostiska material hanteras.
- Pipettera inte med munnen.
- Använd handskar när immundiagnostiska material hanteras och tvätta händerna noggrant efteråt.
- Täck arbetsytan med absorberande engångspapper

Varning

Endast för användning *in vitro*.

- Alla reagenser och laboratorieutrustning skall hanteras som infekterat avfall.
- Använd ej testets beståndsdelar efter utgångsdatum och blanda inte reagenser från olika lotnummer.

Storage

Förvara Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA efter mottagandet vid 2-8°C. Vid förvaring vid denna temperatur är reagenserna stabila till och med utgångsdatum på kartongen.

MATERIAL

Provtagning

Eftersom benresorptionsmarkörer uppvisar cirkadisk variation, primärt reglerat av födointag (18), är det rekommenderat att ta morgonurin (andra kastningen) efter en natts fasta.

Håll urinprover kylda (2-8°C) i upp till en vecka. Vid längre förvaring bör proverna frysas (<-18°C). Notera också att optimalt resultat fås om proverna blandas om och därefter centrifugeras (e.g. 2000g; 10 min) före användning.

Bifogat material

Innan användning, läs stycket om **Försiktighetsåtgärder**. Kartongen innehåller reagenser för 96 mätningar.

Streptavidinbehandlad mikrotiterplatta **MICROPLAT**

Microwell strips (12x8 brunnar) förbehandlade med streptavidin. Levereras med plastram.

CrossLaps Standard **CAL - 0**

En vial (min. 10.0 mL/vial) med bruksfärdig PBS-buffrad lösning med proteinstabilisator och konserveringsmedel.

CrossLaps Standard **CAL 1 - 5**

Fem vialer (min. 0.4mL/vial) med bruksfärdig, CrossLaps standard i en PBS-buffrad lösning med proteinstabilisator och konserveringsmedel. Det exakta värdet för varje standard står tryckt på Kvalitetskontrollrapport.

Kontroll **CTRL 1 - 2**

Två vialer (min. 0.4mL/vial) CrossLaps peptid i en PBS-buffrad lösning med proteinstabilisator och konserveringsmedel. Se det bifogade Kvalitetskontrollrapport för närmre specificering.

Biotinylerad antikropp **Ab BIOTIN**

En vial (min. 0.25 mL) med koncentrat av biotinylerad monoklonal antikropp från råtta (murine) som är specifik för nedbrytningsprodukter från C-terminal telopeptide av kollagen typ I. Beredd i en buffrad lösning med proteinstabilisator och konserveringsmedel.

Peroxidasekonjugerad antikropp **ENZYMCNJ**

En vial (min. 0.25 mL) med koncentrat av peroxidasekonjugerad monoklonal antikropp från råtta (murine) specifik för nedbrytningsprodukter från C-terminal telopeptid av kollagen typ I. beredd i en buffrad lösning med proteinstabilisator och konserveringsmedel.

Inkubationsbuffert **BUF**

En vial (min. 19 mL) med bruksfärdig buffrad lösning med proteinstabilisator, vätnedel och konserveringsmedel.

Substratlösning **SUBS TMB**

En vial (min. 12 mL) med bruksfärdig tetrametylbenzidine (TMB) substrat i en sur buffert. Notera att det kromogena substratet kan verka en aning blåfärgat.

Stopplösning **H2S04**

En vial (min. 12 mL) med bruksfärdig 0,18 mol/l svavelsyra.

Tvättbuffert **WASHBUF 50x**

En vial (min. 20 mL) med koncentrerad tvättbuffert med vätnedel och konserveringsmedel.

Förseglingstejp

Självhäftande film att försegla brunnarna med under inkubation.

Material som behövs och ej ingår

- Käril för blandning av antikroppslösning och tvättlösning
- Automatpipetter med hög precision för 10-200 µL
- Destillerat eller avjoniserat vatten
- Automatpipetter med 8 eller 12 kanaler för 100 µL and 150 µL
- Skakapparat för mikrotiterplattor
- Spektrofotometer för mikrotiterplattor

MÄTPROCEDUR

Mätprocedur

För optimalt resultat av mätningen är det av stor vikt att följa nedan givna instruktioner.

Låt alla reagens uppnå rumstemperatur (18-22°C) före användning. Bestäm antalet strips som behövs. Det rekommenderas att alla prov körs i duplikat. Utöver dessa behövs för varje körning 16 brunnar för standard och kontroll.

Placera lämpligt antal strips i plastramen. Förvara oanvända strips i foliepåsen tillsammans med torkmedel. Bered alla reagens och prover före användning enligt anvisningarna nedan. Undvik skumbildning.

1 Beredning av antikropps lösning:

NOTERA: Förbered följande **antikropps lösning** maximalt **30 minuter** innan mätning påbörjas. Blanda biotinylerad antikropp **Ab BIOTIN**, peroxidaskonjugerad antikropp **ENZYMCONJ** och inkubationsbuffer **BUF** i volymetrisk ratio 1+1+100 i ett tomt kärl. Blanda noggrant, undvik skumbildning. **Gör en ny lösning innan varje analys**

2 Spädning av prover

Alla prover (alla okända samt **CTRL 1 - 2**), utom de standardlösningar som levererats med kittet ska spädas 1+3 i standard 0 före test (t.ex. 20 µL+60 µL).

3 Enstegs inkubation

Pipettera 10 µL utspädd **Standard CAL 0 - 5**, förutspädd **Kontroll**, och förutspädda okända prover i respektive brunn följt av 150 µL nyberedd **antikropps lösning**. Försegla immunostripsen med förseglingstejpen och inkubera i 120±5 minuter vid rumstemperatur (18-22°C) på ett skakbord (300 rpm).

4 Tvättning

Tvätta immunostripsen manuellt 5 gånger med 300 µL **tvättbuffert (WASHBUF 50x)** förutspädd 1+50 i destillerat vatten). Vid användning av automatisk platttvätt, följ tillverkarens anvisningar eller laboratoriets egna rutiner. Vanligen räcker det med 5 tvättcykler. Säkerställ att brunnarna är **fullständigt tömda** efter varje manuell eller automatisk tvättcykel.

5 Inkubation med kromogen substratlösning

Pipettera 100 µL **substratlösning SUBS TMB** i varje brunn och inkubera i 15±2 minuter i mörker vid rumstemperatur (18-22°C) på ett skakbord (300 rpm). Använd förseglingstejp. Pipettera inte direkt från vialen med TMB-substrat utan överför den mängd som behövs till en ren behållare och pipettera därifrån. Överbliven substratlösning skall kasseras och inte hållas tillbaka i vialen.

6 Stoppa färgreaktionen

Pipettera 100 µL **stopplösning H2SO4** i varje brunn.

7 Absorbansmätning

Mät absorbansen, inom två timmar, vid 450 nm med 650 nm som referens.

Begränsningar

Om absorbansvärdet hos ett prov överstiger värdet för **Standard 5**, ska provet spädas ytterligare i **Standard 0** och analyseras om.

KVALLITETSKONTROLL

God laboratoriepraxis (GLP) kräver att kvalitetskontrollprover används i var serie av mätningar för att kontrollera metodens utförande. Kontroller skall behandlas som okända prov, och resultaten analyseras med lämpliga statistiska metoder.

RESULTAT

Beräkning av resultat

Använd en kvadratisk kurvanpassning för bästa resultat.

Beräkna gärna medelvärden av duplikatens absorbansvärden. Konstruera en standardkurva på millimeterpapper, eller i en lämplig mjukvara, med de sex standardvärderna (x-axel) mot motsvarande CrossLaps koncentrationer (y-axel). Bestäm koncentrationen av CrossLaps i kontrollerna och varje patientprov genom interpolering.

Exempel på resultat:

Standarder/ kontroller/ prov	CrossLaps konc. (µg/l)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	Medelv A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolerad CrossLaps konc. (µg/l)	Konc. korr. för 4X spädning (µg/l)
Standard 0	0,00	0,046 / 0,045	0,046		
Standard 1	1,43	0,164 / 0,160	0,162		
Standard 2	4,24	0,402 / 0,383	0,393		
Standard 3	8,27	0,742 / 0,700	0,721		
Standard 4	16,6	1,461 / 1,366	1,414		
Standard 5	23,7	2,027 / 1,923	1,975		
Kontroll 1		0,327 / 0,319	0,323	3,38	13,5
Kontroll 2		1,216 / 1,173	1,195	14,0	55,9
Prov I		0,162 / 0,150	0,156	1,36	5,44
Prov II		0,507 / 0,500	0,504	5,56	22,2
Prov III		1,173 / 1,082	1,128	13,2	52,6

Observera: Data visade ovan är ett exempel och skall inte användas för att beräkna resultat av mätning.

Beräkning av korrigerade CrossLaps värden

För varje prov skall koncentrationen av CrossLaps (ng/mL) samt kreatinin bestämmas. Bestäm kreatininkoncentrationen (mmol/l) i provet med en enzymatisk kolorimetrisk rutinmetod för klinisk kemiskt analysinstrument. Använd följande ekvation för att beräkna det korrigerade värdet:

$$\text{Korr. CrossLaps } (\mu\text{g}/\text{mmol}) = \frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Creatinine (mM)}}$$

Performance characteristics

Detektionsgräns: 0,80 µg/L CrossLaps

Detta är den koncentration som motsvarar tre standardavvikelser ovan genomsnittet av 21 bestämningar av *blanken* (CrossLaps Standard 0) multiplicerat med spädningfaktor 4.

Precision ≤ 6.9%

Precisionen hos Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA utvärderades för tre urinprover. Resultaten presenteras summariskt i tabellen nedan (resultaten har inte korrigerats för spädning)

Intraassay ≤ 3.9% (n=10)			Interassay ≤ 6.9% (n=10)		
Medel (µg/l)	SD (µg/l)	CV (%)	Medel (µg/l)	SD (µg/l)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Spädning/Linjäritet

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA är linjär i området 0.20 ng/mL till 40.7 ng/mL CrossLaps.

Urinprov med koncentrationen 16.7 – 52.8 ng/mL CrossLaps späddes med standard 0 och koncentrationen av CrossLaps bestämdes med Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA.

Data nedan är beräknade från 3 olika urinprover

Dilution Procedure								
Urin [%]	Std. 0 [%]	Prov 1		Prov 2		Prov 3		Overall recovery (%)
		Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	
100	0	16.68	100	23.36	100	52.80	100	100
90	10	15.00	103	21.00	105	47.52	110	106
80	20	13.32	100	18.68	104	42.24	109	104
70	30	11.68	95	16.36	99	36.96	110	101
60	40	10.00	96	14.00	98	31.68	104	99
50	50	8.32	97	11.68	88	26.40	99	95
40	60	6.68	96	9.32	87	21.12	94	93
30	70	5.00	96	7.00	88	15.84	84	90
20	80	3.32	96	4.68	86	10.56	84	89
10	90	1.68	87	2.32	90	5.28	76	85
Mean								96

RC: Recovery, Exp: Expected

Förväntade värden

Det rekommenderas att laboratoriet själv bestämmer gränsvärden för normala och patologiska värden.

Population	Antal individer (n)	Ålder (År)	Geometriskt Medelvärde (µg/mmol)	95% CI
Pre-menopausala kvinnor	25	40-49	1,66	0.83-3.32
Post-menopausala kvinnor	272	52-75	2,27	0.73-7.07
Män	25	50-78	1,46	0.53-4.04

Daglig individuell variation

Den dagliga intra-individa variationen uppskattades genom analys av urinprover (morgon, fasta) från 11 friska postmenopausala kvinnor vid 5 tillfällen över 2 veckor.

Individ nr	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA (µg/mmol) per besök					Mean (µg/mmol)	SD (µg/mmol)	CV (%)
	1	2	3	4	5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

ÚVOD

Účel použití

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA je enzymový imunologický test na kvantifikaci degradačních produktů C-terminálních telopeptidů kolagenu typu I v lidské moči.

Stanovení Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA může být použito jako pomůcka při indikaci kostní resorpce u člověka.

A. Monitorování změn kostní resorpce

1) Anti resorpční terapie u postmenopauzálních žen:

a) Hormonální substituční terapie (HRT) pomocí hormonů a podobných léčiv

b) Bisfosfonátová terapie

B. Předpověď skeletální reakce (kostní hustoty - BMD) u postmenopauzálních žen podstupujících antiresorpční terapii

a) Hormonální substituční terapie (HRT) pomocí hormonů a podobných léčiv

b) Bisfosfonátová terapie

Omezení

Tento test není určen pro předpověď rozvoje osteoporózy nebo budoucího rizika zlomeniny.

Shrnutí a výklad testu

Kolagen typu I představuje více než 90% organické hmoty kosti a je syntetizován primárně v kosti (1). Během obnovy kostry je typ I kolagenu degradován a malé fragmenty peptidu jsou vylučovány do moči. Tyto fragmenty mohou být měřeny pomocí Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA. Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA vykazuje vysoký stupeň korelace s odpovídajícím měřením vzorků séra u Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA. Serum CrossLaps® (CTX-I) ELISA je uváděn jako vhodná pomůcka při sledování antiresorpční léčby pacientů s metabolickým onemocněním kostí (3 17).

Princip procedury

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA je založen na dvou vysoce specifických monoklonálních protilátkách proti aminokyselinové sekvenci EKAHD-β-GGR, kde je reziduum kyseliny aspartamové (D) β-izomerizováno. Pro získání specifického signálu u Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA musí být zesíťeny dva řetězce EKAHD-β-GGR.

Standardy, kontroly nebo neznámé vzorky moči jsou pipetovány do příslušných mikrotitračních jamek potažených streptavidinem, pak je aplikována směs biotinylovaných protilátek a peroxidázou konjugovaných protilátek. Poté se vytvoří komplex mezi antigeny CrossLaps®, biotinylovanými protilátkami a peroxidázou konjugovanými protilátkami. Pak se tento komplex váže na povrch streptavidinu přes biotinylované protilátky. Po jedнокrokové inkubaci při 2-8°C jsou jamky vyprázdněny a promyty. Přidá se chromogenní substrát a barevná reakce je zastavena kyselinou sírovou. Nakonec je změřena absorbance.

UPOZORNĚNÍ

V laboratoři je třeba dodržovat následující opatření:

- Nejezte, nepijte nebo nekuřte v prostorách, kde pracujete s imunodiagnostickým materiálem.
- Nepipetujte ústy.
- Při práci s imunodiagnostickým materiálem používejte rukavice a dobře si pak umyjte ruce.
- Pracovní plochu překryjte jednorázovým absorbčním papírem.

Varování

Pouze pro použití in vitro.

- Všechny reagenty a laboratorní zařízení by měly být při nakládání považovány za infekční.
- Nepoužívejte složky kitu po datu expirace na obalu a nemíchejte reagenty různých šarží.

Uchovávání

Po převzetí uchovávejte BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA kit při 2-8°C. Za těchto podmínek je stabilní až do data expirace na obalu.

MATERIÁLY

Odběr vzorku

Jelikož má kostní resorpce výraznou kolísavost během dne primárně regulovanou příjmem potravy (18), je doporučeno použít sekundární ranní moč získanou po hladovění přes noc.

Vzorky moči mohou být zchlazené (2-8°C) až po dobu jednoho týdne nebo zmrazené vzorky (<-18°C) při delším uchovávání. Pamatujte, že pro optimální výsledek je doporučeno vzorky promíchat a pak centrifugovat (např. 2000g; 10 min) před použitím.

Dodávaný materiál

Před použitím kitu si prosím přečtěte sekci Opatření. Kit obsahuje dostatek reagentů pro 96 stanovení.

Streptavidinem potažené mikrotitrační destičky MICROPLAT

Mikrojамkové stripy (12x8 jamek) předem potažené streptavidinem. Dodávané v plastovém rámečku.

CrossLaps® standard CAL 0

Jedna lahvička (min. 10.0 ml/lahv.) k použití přímo s PBS pufovaným roztokem, proteinovým stabilizátorem a konzervační látkou.

CrossLaps® standardy CAL 1 - 5

Pět lahviček (min. 0.4ml/lahv.) k použití přímo, CrossLaps® standard v PBS pufovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem a konzervační látkou. Přesná hodnota každého standardů je uvedena na Certifikátu kontroly kvality.

Kontroly CTRL 1 - 2

Dvě lahvičky (0.4ml/lahv.) CrossLaps® peptidu v PBS pufovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem a konzervační látkou. Seznamte se v příloženém certifikátu s kontrolním rozmezím.

Biotinylovaná protilátka Ab BIOTIN

Jedna lahvička (0.25 ml) koncentrovaného roztoku biotinylované monoklonální myší protilátky specifické pro degradační produkty C terminálních telopeptidů kolagenu typu I. Připraveno v pufovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem a konzervační látkou.

Peroxidázou konjugovaná protilátka ENZYMCONJ

Jedna lahvička (0.25 ml) koncentrovaného roztoku peroxidázou konjugované myší monoklonální protilátky specifické pro degradační produkty C terminálních telopeptidů kolagenu typu I. Připraveno v pufovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem a konzervační látkou.

Inkubační pufr BUF

Jedna lahvička (min. 19 ml) k přímému použití s pufovaným roztokem proteinového stabilizátoru, detergentu a konzervační látky.

Roztok substrátu SUBS TMB

Jedna lahvička (min. 12 ml) k přímému použití s tetrametylbenzidínovým (TMB) substrátem v kyselém pufru. Mějte na paměti, že se chromogenní substrát může jevit lehce namodralý.

Zastavovací roztok H2S04

Jedna lahvička (min. 12 ml) k přímému použití s 0.18 mol/l kyseliny sírové.

Promývací roztok WASHBUF 50x

Jedna lahvička (min. 20.0 ml) koncentrovaného promývacího roztoku s detergentem a konzervační látkou.

Krycí páska

Adhezivní film pro překrytí jamek během inkubace.

Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- Kontejner na přípravu roztoku protilátky a promývacího roztoku.
- Přesná mikropipeta na 10-200 µl.
- Destilovaná voda
- Přesná 8 nebo 12-kanálová multipipeta na 100 µl a 150µl.
- Zařízení na promíchání mikrodestiček
- Reader na mikrotitrační destičky

POSTUP STANOVENÍ

Postup

Pro optimální provedení stanovení je důležité se seznámit s níže uvedeným postupem. Všechny reagenty před použitím vytemperujte na pokojovou teplotu (18-22°C). Zjistěte počet stripů potřebných pro stanovení. Je doporučeno testovat všechny vzorky duplicitně. Dále je potřeba v každém běhu celkem 16 jamek pro standardy a kontroly. Dejte potřebný počet stripů do plastového rámečku. Nepoužité stripy uchovávejte dobře uzavřené ve fóliovém sáčku s vysoušečem. Všechny reagenty a vzorky před použitím dobře promíchejte (dejte pozor na tvorbu pěny).

1 Příprava roztoku protilátek:

UPOZORNĚNÍ: Připravte roztok protilátek maximálně 30 minut před započatím stanovení. Smíchejte biotinylovaná

protilátka **Ab BIOTIN**, peroxidázou konjugovaná protilátka **ENZYMCONJ** a inkubační pufr **BUF** v poměru objemů 1+1+100. Opatrně míchejte a zabraňte tvorbě pěny. Připravte čerstvý roztok před každým během stanovení.

2 Předředění testovaných vzorků

Všechny vzorky (neznámé vzorky a **CTRL 1 - 2**), vyjma dodaných standardů, musí být předem zředěny 1+3 ve standardu 0 před testováním (např. 20 µl + 60 µl).

3 Jednokroková inkubace

Pipetujte 10 µl neředěných standardů **CAL 0 - 5**, předem zředěných kontrol a předem zředěných neznámých vzorků do příslušných jamek a dále 150 µl roztoku protilátky. Imunostripy překryjte krycí páskou a inkubujte po 120±5 minut za pokojové teploty (18-22°C) na zařízení pro promíchávání destiček (300 rpm).

4 Promývání

Imunostripy promyjte pětkrát ručně s 300 µL použitím promývacího roztoku (**WASHBUF 50x** zředěného 1 + 50 destilovanou vodou). Při automatickém promytí destičky dodržujte instrukce výrobce nebo návod laboratoře. Obyčejně je 5 promývacích cyklů adekvátní. Ujistěte se, že jsou jamky kompletně prázdné po každém ručním nebo automatickém promývacím cyklu.

5 Inkubace s roztokem chromogenního substrátu

Pipetujte 100 µl roztoku substrátu **SUBS TMB** do každé jamky a inkubujte po 15±2 minuty za pokojové teploty (18-22°C) ve tmě na třepačce (300rpm). Použijte krycí pásku. Nepipetujte přímo z lahvičky obsahující TMB substrát, ale přeneste si potřebný objem do čisté nádoby. Zbývající substrát v této nádobce musí být zlikvidován a nesmí být vrácen do originální lahvičky.

6 Zastavení barevné reakce

Pipetujte 100 µl zastavovacího roztoku **H2S04** do každé jamky.

7 Měření absorbance

Měřte absorbanci při 450 nm s 650nm jako referencí během dvou hodin.

Omezení postupu

Pokud absorbance vzorků překročí absorbanci standardu 5, musí být vzorek dále zředěn v standardu 0 a analyzován znovu.

KONTROLA KVALITY

Požadavky správné laboratorní praxe (GLP) vyžadují kontrolu kvality vzorků v každé sérii stanovení, aby se ověřilo provedení stanovení. Kontroly musí být zpracovány jako neznámé vzorky a výsledky analyzovány příslušnými statistickými metodami.

VÝSLEDKY

Výpočet výsledků

Pro křivku je doporučen kvadratický fit.

Jako alternativu lze použít výpočet průměru duplicitně určených absorbancí. Sestrojte standardní křivku na grafický papír vynesáním průměrných absorbancí šesti standardů (ordináta) proti odpovídajícím koncentracím CrossLaps® (abscisa).

Určete koncentraci CrossLaps® u kontrol a každého patientského vzorku interpolací.

Příklad získaných výsledků

Standardy/ kontroly/ vzorky	CrossLaps konc. (µg/l)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	průměr A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolace konc. CrossLaps (µg/l)	Korekce konc. pro zředění 4X (µg/l)
Standard 0	0,00	0,046 / 0,045	0,046		
Standard 1	1,43	0,164 / 0,160	0,162		
Standard 2	4,24	0,402 / 0,383	0,393		
Standard 3	8,27	0,742 / 0,700	0,721		
Standard 4	16,6	1,461 / 1,366	1,414		
Standard 5	23,7	2,027 / 1,923	1,975		
Kontrola 1		0,327 / 0,319	0,323	3,38	13,5
Kontrola 2		1,216 / 1,173	1,195	14,0	55,9
vzorek I		0,162 / 0,150	0,156	1,36	5,44
vzorek II		0,507 / 0,500	0,504	5,56	22,2
vzorek III		1,173/ 1,082	1,128	13,2	52,6

Poznámka: Výše uvedená data slouží pouze pro ilustraci a nemohou být použita pro výpočet výsledků.

Výpočet korigované hodnoty CrossLaps®

Pro každý vzorek moči určete koncentraci CrossLaps® (ng/ml) a koncentraci kreatininu (mM= mmol/l) za použití enzymatické kolometrické metody pro analyzátor klinické chemie a proveďte korekci s použitím následující rovnice:

Korekce hodnoty CrossLaps (µg/mmol) = $\frac{\text{CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Kreatinin (mM)}}$

Charakteristiky provedení

Detekční limit: 0.80 µg/l CrossLaps®

Jde o koncentraci odpovídající třem standardním odchylkám nad průměr 21 stanovení blanku ("CrossLaps® Standard 0") vynásobenou dilučním faktorem 4

Přesnost < 6.9%

Přesnost Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA byla hodnocena pro tři vzorky moči. Výsledky jsou shrnuty v tabulce níže (tyto výsledky nebyly korigovány dilučním faktorem)

Uvnitř stanovení <3.9% (n=10)			Mezi stanoveními <6.9% (n=10)		
Průměr (µg/l)	SD (µg/l)	CV (%)	Průměr (µg/l)	SD (µg/l)	CV (%)
5.38	0.05	3.9	5.38	0.05	3.6
21.6	0.15	2.9	21.6	0.37	6.9
56.0	0.42	3.0	56.0	0.66	4.7

Ředění/linearita

Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA je lineární v rozmezí 0.20 ng/ml až 40.7 ng/ml CrossLaps®.

Vzorky moči s koncentrací 16,7 – 52,8 ng/ml CrossLaps® byly zředěny ve standardu 0 a byla určena koncentrace CrossLaps® pomocí Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA.

Data uvedená níže jsou vypočtena ze 3 různých vzorků moči

Postup ředění								
moč [%]	Std. 0 [%]	vzorek 1		vzorek 2		vzorek 2		celková výtěžnost (%)
		Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	Exp. (µg/L)	RC (%)	
100	0	16.68	100	23.36	100	52.80	100	100
90	10	15.00	103	21.00	105	47.52	110	106
80	20	13.32	100	18.68	104	42.24	109	104
70	30	11.68	95	16.36	99	36.96	110	101
60	40	10.00	96	14.00	98	31.68	104	99
50	50	8.32	97	11.68	88	26.40	99	95
40	60	6.68	96	9.32	87	21.12	94	93
30	70	5.00	96	7.00	88	15.84	84	90
20	80	3.32	96	4.68	86	10.56	84	89
10	90	1.68	87	2.32	90	5.28	76	85
průměr								96

RC: výtěžnost, Exp: očekávané

Očekávané hodnoty

Je pro každou laboratoř dobré stanovit si svůj vlastní rozsah normálních a patologických hodnot.

Populace	počet subjektů (n)	věk (roky)	Geometrický střed hodnot (µg/mmol)	95% CI
Premenopauzální ženy	25	40-49	1,66	0.83-3.32
Postmenopauzální ženy	272	52-75	2,27	0.73-7.07
Muži	25	50-78	1,46	0.53-4.04

Individuální variabilita mezi jednotlivými dny

Byla zjišťována analýzou vzorků moči (první ranní) od 11 zdravých postmenopauzálních žen pětkrát během 2 týdnů.

Subjekt č.	Urine BETA CrossLaps® (CTX-I) ELISA (µg/mmol) per návštěva					střed (µg/mmol)	SD (µg/mmol)	CV (%)
	1	2	3	4	5			
1	3.04	3.17	3.88	3.50	4.06	3.53	0.44	12
2	0.96	1.21	0.99	1.17	1.17	1.04	0.14	13
3	1.15	1.04	1.56	1.78	1.78	1.34	0.31	23
4	1.33	1.51	1.65	0.99	0.99	1.42	0.27	19
5	1.35	1.60	1.54	1.37	1.37	1.43	0.14	10
6	2.40	1.91	1.88	1.90	1.90	2.11	0.29	14
7	1.29	1.04	1.18	1.32	1.32	1.21	0.11	9
8	1.18	1.21	1.20	1.07	1.07	1.22	0.14	11
9	5.77	5.67	4.92	4.78	4.78	5.59	0.81	15
10	1.42	1.40	1.28	1.22	1.22	1.26	0.18	14
11	4.33	4.47	5.61	5.14	5.14	5.07	0.64	13

REFERENCES






1. Rosenquist C. et al., Serum CrossLaps® ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin. Chem* (1998); 44; 2281-2289.
2. Christgau S. et al., Clinical evaluation of the Serum CrossLaps® ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C telopeptides. *Clin Chem* (1998); 44; 2290-2300.
3. Bjarnason NH. et al., 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.
4. 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.
5. 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.
6. Ravn P, Clemmesen B, Christiansen C. Biochemical markers can predict the response in bone mass during alendronate treatment in early postmenopausal women. *Bone* (1999); 24: 237-244.
7. Rosen HN. et al., Serum CTX: A new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* (2000); 66: 100-103.
8. Tanko LB. et al., Safety and efficacy of a novel salmon Calcitonin (sCT) technology-based oral formulation in healthy postmenopausal women: acute and 3-month effects on biomarkers of bone turnover. *J Bone Miner Res* (2004); 19:1531-1538.
9. Warming L. et al., Safety and efficacy of drospirenone used in a continuous combination with 17beta-estradiol for prevention of postmenopausal osteoporosis. *Climacteric* (2004); 7: 103-111.

Doc: AC-05PL-A

Issue: 08

Date: 11 October 2022

Example Version

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

	<p>GB <i>EU Importer</i> DE <i>EU-Importeur</i> IT <i>Importatore UE</i> DK <i>EU Importør</i> CZ <i>EU Dovoze</i> PT <i>Importador UE</i> SE <i>EU Importör</i></p>
---	--



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