

ALPHA CrossLaps[®] (CTX-I) EIA

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

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 från C-terminal telopeptid från kollagen Typ-I i human urin.



AC-04F1



96

English	3
Deutsch	8
Português.....	13
Dansk.....	18
Svenska	23

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

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

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA 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 ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA kit eller för några konsekvenser av tolkningen av dessa resultat.

INTRODUCTION

Intended use

The ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of non-isomerized fragments of C-terminal telopeptides of Type-I collagen (α CTX-I) in human urine.

The ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA is intended for use as an indicator of degradation of non-isomerized bone collagen and may be used as an aid in the identification of skeletal metastases in patients with breast and prostate cancer.

In addition, the ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA may be applied to humans as an aid in the diagnosis of Paget's disease and the monitoring of anti-resorptive therapy in patients with Paget's disease

Limitations

The use of the test has not been established for determination of the level of bone resorption.

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. 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 ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA.

The measurements of the specific degradation products of Type I collagen (ALPHA CrossLaps) in human urine have been reported as useful assessment of bone resorption in Paget's disease (1) and for detection of bone metastases in prostate (2, 5) and breast cancer (3, 4, 5, 6).

Principle of the procedure

The ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA is based on one highly specific monoclonal antibodies against the amino acid sequence of EKAHDGGR. In order to obtain a specific signal in the ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA, two chains of EKAHDGGR must be cross linked.

Standards, control, or unknown urine samples are pipetted into the appropriate microtitre wells coated with streptavidin, followed by application of a mixture of biotinylated antibody and peroxidase-conjugated antibody. Then, a complex between ALPHA 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 2-8°C, 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, smoke or apply cosmetics where immunodiagnostic materials are being handled
- Do not pipette by mouth.
- Wear gloves when handling immunodiagnostic materials and wash hands thoroughly afterwards
- Cover working area with disposable absorbent paper

Warnings

For in vitro use only.

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

Storage

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

MATERIALS

Specimen collection

It is recommended to use second morning void urine specimens from fasting individuals.

Urine samples are stable for 7 days at 4°C. For longer storage, the urine samples should be stored frozen (< -18°C).

Prior to use, urine specimens should be shaken and sedimentation allowed for a minimum of 30 minutes.

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.

Standard **CAL 0**

One vial (min. 12.0 mL) of ready-for-use solution with protein stabiliser, detergent and preservative.

Standards **CAL 1 - 5**

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

Control **CTRL 1 - 2**

Two vials (min. 0.4 mL) of ready-for-use, di-peptide in a buffered solution with protein stabiliser, detergent and preservative. Please refer to enclosed QC Report for control range.

Biotinylated Antibody **Ab BIOTIN**

One vial (min. 0.2 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, detergent 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, detergent and preservative.

Incubation Buffer **BUF**

One vial (min. 15.0 mL) of a ready-for-use buffered solution with protein stabiliser, detergent and preservative.

Substrate Solution **SUBS TMB**

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

Stopping Solution **H2O4**

One vial (min. 12.0 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 25-200 µL
- Distilled or deionized water
- Precision 8- or 12-channel multipipette to deliver 100 µL
- ELISA plate reader with 450 nm, and 650 nm as reference wavelength

ASSAY PROCEDURE

Prior to use, prepare and equilibrate all solutions to room temperature (18-22°C). Mix all reagents and samples before use (avoid foam). **Perform the assay at 18-22°C.**

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

1 Pre-dilution of urine samples

Dilute kit controls **CTRL 1 - 2** supplied with the kit and urine samples 1+7 in **Standard 0** **CAL 0** prior to testing (e.g. 25+175 µL).

2 Preparation of the Antibody Solution:

ATTENTION: Prepare the **Antibody Solution** immediately before use. The **Antibody Solution** is prepared by mixing the Biotinylated Antibody **Ab BIOTIN**, Peroxidase Conjugated Antibody **ENZYMCNJ** 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.**

3 One Step incubation

Pipette 25 µL of either **Standards** **CAL 0 - 5**, Control or unknown samples into appropriate wells followed by 100 µL of the **Antibody Solution**. Cover the immunostrips with sealing tape and incubate for **60±5 minutes at 2-8°C** without shaking.

4 Washing

Wash the immunostrips 5 times manually with 300 µL **Washing Buffer** (**WASHBUF** diluted 1+50 in distilled or deionized 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 without shaking. 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 the vial with TMB.

6 Stopping of colour reaction

Pipette 100 µL of the **Stopping Solution** **H2SO4** 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 (pre-diluted) sample is above 5.0 ng/mL, the sample should be additionally 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

It is recommended to use a **4-parameter** curve fit.

Example of results obtained:

Standards/ Controls/ Samples	ALPHA CrossLaps conc. (ng/mL)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs) Obs 1/ Obs 2	Mean A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs)	ALPHA CrossLaps Interpolated conc. (ng/mL)	ALPHA CrossLaps Conc. corrected for dilution x8 (ng/mL)
Standard 0	0.00	0.008 / 0.009	0.009		
Standard 1	0.50	0.031 / 0.029	0.030		
Standard 2	1.12	0.145 / 0.135	0.140		
Standard 3	3.22	0.929 / 0.873	0.901		
Standard 4	4.59	1.534 / 1.350	1.442		
Standard 5	5.92	1.975 / 1.888	1.932		
Control 1		0.655 / 0.535	0.595	2.49	19.9
Control 2		1.170 / 1.146	1.158	3.86	30.9
Sample I		0.569 / 0.600	0.585	2.03	16.2
Sample II		0.293 / 0.285	0.289	1.23	9.84
Sample III		0.159 / 0.155	0.157	0.66	5.26

Please note:

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

Calculation of corrected ALPHA CrossLaps value

For each urine sample the ALPHA CrossLaps concentration (ng/mL) and the creatinine concentration (mM= mmol/L) should be determined using an enzymatic colometric method for clinical chemistry analyzers (e.g. CREA plus for Roche/Hitachi analyzers) or equivalent.

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

$$\text{ALPHA CrossLaps (ng/mL)}$$

Corr. ALPHA CrossLaps Value (µg/mmol) =

$$\text{Creatinine (mmol/L)}$$

Performance characteristics

Detection limit: 0.80 ng/mL ALPHA CrossLaps

This is the concentration corresponding to three standard deviations above the mean of 21 determinations of the blank (Standard 0) multiplied by the dilution factor 8.

Precision

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

InterAssay Variation (n=10)

IntraAssay Variation (n=10)

Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5,21	0,30	5,8
3,19	0,17	5,3
1,15	0,11	9,4

Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5,21	0,07	1,4
3,19	0,07	2,3
1,15	0,02	2,0

Dilution/Linearity

The ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA is linear in the range 0.10 ng/mL to 5.00 ng/mL (before correction of dilution) of ALPHA CrossLaps.

Urine samples with the concentration of 6.32-13.36 (corrected for dilution) were diluted in **Standard 0** and the concentration of ALPHA CrossLaps were determined with ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA . The urine neat sample is set to 100%

Dilution	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
Sample vs. diluent	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)
Neat	0.79	0.79	100	1.67	1.67	100	1.16	1.16	100
1+1	0.38	0.39	97	1.00	0.83	120	0.59	0.58	102
1+3	0.19	0.20	97	0.49	0.42	117	0.28	0.29	98
1+8	0.10	0.10	104	0.21	0.21	100	0.14	0.14	96

Obs.: Observed, Exp.: Expected, RC: Recovery.

Interference:

To be determined.

Expected values

It is advisable for a laboratory to establish its own range of normal and pathological values. As an example, the mean values and 95% CI for various populations are given below. For further reading, please refer to the reference list. All samples were morning fasting samples from healthy individuals.

Populations	Number of subjects (n)	Age (Years)	Geometric Mean Values (µg/mmoL)	95% CI
Pre-menopausal women	81	32-49	0.32	0.10 – 0.99
Post-menopausal women	320	43-75	0.62	0.17 – 2.26
Males	209	30-87	0.38	0.13 – 1.13

EINLEITUNG

Verwendungszweck

Der ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA ist ein enzymatimmunologischer Test zur Quantifizierung von nicht-isomerisierten Abbauprodukten C-terminaler Telopeptide des Typ-I Kollagens (α CTX-I) in menschlichem Urin. Der ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA Test wird vorgesehen zur Indikation von Degradation von nicht-isomerisiertem Knochenkollagen und kann verwendet werden als Unterstützung der Identifizierung von Knochenmetastasen in Brust- und Prostatakrebs.

Zusätzlich kann der ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA benutzt werden bei Menschen als Unterstützung in der Diagnose von Paget's und dem Verfolgen von anti-resorptiven Therapien in Patienten mit Pagets.

Einschränkungen

Der Gebrauch des Testes ist nicht etabliert worden, um den Grad der Knochenresorption zu ermitteln.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das Typ I-Kollagen macht mehr als 90 % der organischen Matrix des Knochens aus und wird vorwiegend im Knochen synthetisiert. Während der Erneuerung des Skeletts wird das Typ I-Kollagen abgebaut und kleine Peptidfragmente werden über den Urin ausgeschieden. Diese Fragmente können mit dem ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA gemessen werden. Das Messen des spezifischen Abbauprodukts von Typ I Kollagen (ALPHA CrossLaps) im humanen Urin wurde als nützliche Ermittlung der Knochenresorption bei Pagets (1) und zur Detektion von Knochenmetastasen in Prostata- (2, 5) und Brustkrebs (3, 4, 5, 6) beschrieben.

Testprinzip

Der ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA basiert auf einen hochspezifischen monoklonalen Antikörper gegen die Aminosäuresequenz des EKAHDGGR. Um ein spezifisches Signal in dem ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA erhalten zu können, müssen zwei Ketten des EKAHDGGR mittels cross-linked verbunden sein.

Standard, Kontrollen und unbekannte Urinproben werden in geeignete 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 2-8°C 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 ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA 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

Es wird empfohlen den zweiten Morgenurin von nüchterne Individuen zu benutzen. Urinproben sind 7 Tage stabil bei 4 und 20°C. Für längere Aufbewahrungen die Urinproben einfrieren (<-18°C). Vor dem Benutzen sollten die Urinproben geschüttelt und mindestens für eine halbe Stunde zur Sedimentation stehen.

Beigefügtes Material

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

Streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten **MICROPLAT**

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

Standard **CAL 0**

Ein Fläschchen (min. 12.0 mL/Fläschchen) gebrauchsfertiger Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel.

Standard **CAL 1- 5**

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

Kontrolle **CTRL 1 - 2**

Zwei Fläschchen (min. 0.4 mL) gebrauchsfertige Dipeptid in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel. Die genaue Konzentration ist dem beigefügten Qualitätskontrollbericht zu entnehmen.

Biotinylierter Antikörper **Ab BIOTIN**

Ein Fläschchen (min. 0.2 mL) einer konzentrierten Lösung von biotinyliertem monoklonalen Mausantikörper spezifisch für Degradationsprodukte der C-terminalen Telo peptide 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 Telo peptide vom Kollagen Typ-I. Zubereitet in einer gepufferten Lösung mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel.

Inkubationspuffer **BUF**

Ein Fläschchen (min. 15 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 50x**

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 25-200 µL
- Destilliertes oder entsalztes Wasser
- Präzisionsmultikanalpipette (8- oder 12 Kanäle) für 100 µL
- Mikrotiterplatten-Ausleser mit 450 nm und 650 nm als Referenzwellenlänge

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 (18-22°C) equilibrieren lassen. Alle Reagenzien und Proben mischen vor dem Gebrauch (Schaumbildung vermeiden).

Die Anzahl der benötigten Teststreifen ermitteln. 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.

1 Verdünnen der Proben

Verdünne die Kitkontrollen **CTRL 1 - 2** in dem Kit und die Urinproben 1+7 in Standard 0 **CAL 0** vor dem testen (z.B. 25+175 µL).

2 Vorbereitung der Antikörperlösung:

ACHTUNG: Die Antikörperlösung direkt vor Gebrauch ansetzen. Die Antikörperlösung wird zubereitet durch das Mischen der biotinyiertem Antikörper **Ab BIOTIN**, peroxidase-konjugierter Antikörper **ENZYMCONJ** und dem Inkubationspuffer **BUF** in den Volumenverhältnissen 1+1+100 in einer leeren Schale. Vorsichtig Mischen und Schaumbildung vermeiden. Eine frische Lösung vor jeden benutzen des Tests ansetzen.

3 Inkubation

25 µL von unverdünntem Standard **CAL 0 - 5**, vorverdünnte Kontrollen und vorverdünnte unbekannte Probe in die dafür vorgesehenen Wells pipettieren gefolgt von 100 µL der Antikörperlösung. Die Immunistrips mit Klebestreifen bedecken und für 60±5 Minuten bei 2-8°C ohne Schütteln inkubieren.

4 Waschen

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

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 ohne Schütteln 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 nr. 4 zurückgeschüttet werden.

6 Stoppen der Farbreaktion

100 µL der Stopplösung **H2SO4** 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 (vorverdünnten) Probe 5.0 ng/mL 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 unbekannte Proben behandelt werden. Die Ergebnisse mit den appropriate statistischen Methoden analysieren.

ERGEBNISSE

Berechnen der Ergebnisse

Zur Auswertung des Testes wird die 4-parametrische Kurvenanpassung empfohlen.

Beispiel von ermittelten Resultaten:

Standards/ Kontrollen/ Proben	ALPHA CrossLaps Konz. (ng/mL)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm) Obs 1/ Obs 2	Mittel-wert A ₄₅₀₋₆₅₀ (nm)	Interpolierte ALPHA CrossLaps konz. (ng/mL)	Konz. korrigierte für 8X Verd. (ng/mL)
Standard 0	0.00	0.008 / 0.009	0.009		
Standard 1	0.50	0.031 / 0.029	0.030		
Standard 2	1.12	0.145 / 0.135	0.140		
Standard 3	3.22	0.929 / 0.873	0.901		
Standard 4	4.59	1.534 / 1.350	1.442		
Standard 5	5.92	1.975 / 1.888	1.932		
Kontrolle		0.655 / 0.535	0.595	2.49	19.9
Kontrolle		1.170 / 1.146	1.158	3.86	30.9
Probe I		0.569 / 0.600	0.585	2.03	16.2
Probe II		0.293 / 0.285	0.289	1.23	9.84
Probe III		0.159 / 0.155	0.157	0.66	5.26

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 ALPHA CrossLaps Konzentration (ng/mL) und die Kreatininkonzentration (mM= mmol/L) ermittelt werden. Die Kreatininkonzentration in den Proben mittels einer standard enzymatisch kalorimetrischen Methode der klinischen Chemie (z.B. CREA plus für Roche/Hitachi Geräte) ermitteln und die Korrektur durch die folgende Gleichung durchführen:

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

Testcharakteristika

Nachweisgrenze: 0.80 ng/mL ALPHA CrossLaps

Dies entspricht der Konzentration von drei Standardabweichungen über dem Mittelwert von 21 Bestimmungen des Nullwertes (Standard 0) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 8.

Präzision

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

InterAssay Variation (n=10)

Mittelwert (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5,21	0,30	5,8
3,19	0,17	5,3
1,15	0,11	9,4

IntraAssay Variation (n=10)

Mittelwert (ng/mL)	SD ng/mL)	CV (%)
5,21	0,07	1,4
3,19	0,07	2,3
1,15	0,02	2,0

Verdünnung/Linearität

Der ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA ist linear im Bereich von 0.10 ng/mL zu 5.00 ng/mL (vor der Verdünnungskorrektur).

Urinproben mit einer Konzentration von 6.32 – 13.66 ng/mL (Verdünnungskorrigiert) werden mit Standard 0 verdünnt und die Konzentration von ALPHA CrossLaps werden mit ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA bestimmt. Die unverdünnte Urinprobe wird als 100% genommen.

Die unten angegebenen Daten sind von 3 verschiedenen Durchläufen errechnet

Dilution	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
Sample vs. diluent	Obs. (ng/mL)	Erw. (ng/mL)	WF (%)	Obs. (ng/mL)	Erw. (ng/mL)	WF (%)	Obs. (ng/mL)	Erw. (ng/mL)	WF (%)
Neat	0,79	0,79	100	1,67	1,67	100	1,16	1,16	100
1+1	0,38	0,39	97	1,00	0,83	120	0,59	0,58	102
1+3	0,19	0,20	97	0,49	0,42	117	0,28	0,29	98
1+8	0,10	0,10	104	0,21	0,21	100	0,14	0,14	96

Obs: Observiert; Erw: Erwartet; WF: Wiederfindung

Interferenzen

Wird ermittelt

Erwartete Ergebnisse

Es ist empfehlenswert, für ein Labor seine eigenen Normwert- und pathologischen Bereiche zu etablieren. Als ein Beispiel werden die Mittelwerte und 95% CI für einige Populationen unten angegeben. Für weitere Information wird die Literaturliste empfohlen. Alle Proben waren morgen nüchtern von gesunden Individuen entnommen

Populations	Anzahl Individuen (n)	Alter (Jahre)	Geometrischer Mittelwert (µg/mmol)	95% CI
Prämenopausale Frauen	81	32-49	0.32	0.10 – 0.99
Postmenopausal Frauen	320	43-75	0.62	0.17 – 2.26
Männer	209	30-87	0.38	0.13 – 1.13

INTRODUÇÃO

Utilização proposta

O ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA é um ensaio de imunoabsorção enzimática para a quantificação de fragmentos não isomerizados de telopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo-I (α CTX-I) em urina humana.

O ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA é destinado ao uso como indicador de degradação do colágeno de osso não isomerizado e pode ser usado com um apoio na identificação de metástases esqueléticas nos pacientes com câncer na mama e próstata.

Além disso, o ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA pode ser utilizado em humanos como um apoio no diagnóstico da doença de Paget e o monitoramento da terapia anti-reabsorção nos pacientes com doença de Paget.

Limitações

A utilização do teste não foi estabelecida para determinação do nível de reabsorção óssea.

Resumo e explicação do teste

O colágeno Tipo-I repõe por mais de 90% da matriz orgânica do osso e é sintetizado primariamente no mesmo. Durante a renovação do esqueleto, o colágeno Tipo-I é degradado e pequenos fragmentos peptídicos são expelidos para a corrente sanguínea. Estes fragmentos podem ser mensurados pelo ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA. As medições de produtos específicos de degradação do colágeno TIPO I (ALPHA CrossLaps) na urina humana têm sido reportadas como sendo uma avaliação útil da reabsorção óssea na doença de Paget (1), para detecção de metástases ósseas na próstata (2,5) e câncer de mama (3, 4, 5, 6).

Princípio do procedimento

O ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA está baseado em um anticorpo monoclonal altamente específico contra a sequência de aminoácido EKAHDGGR. Para obter um sinal específico no ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA, duas cadeias de EKAHDGGR devem estar apresentando ligações cruzadas.

Os padrões, o controle ou as amostras desconhecidas 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 ALPHA 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 de 2-8°C, as cavidades são esvaziadas e lavadas. Um substrato cromogênico é adicionado e a reação de cor é interrompida com ácido sulfúrico. Finalmente, a absorbância é medida.

PRECAUÇÕES

As precauções a seguir devem ser observadas no laboratório:

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos no mesmo local onde os materiais de imunodiagnóstico estão sendo manuseados.
- Não utilize a boca para pipetar.
- Utilize luvas 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 infecciosos.
- Não utilize componentes do kit após a data de vencimento e não misture reagentes de lotes diferentes.

Armazenamento

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

MATERIAIS

Coleta da amostra

É recomendado o uso de amostras do segundo jato de urina da manhã de indivíduos em jejum.

As amostras de urina são estáveis por 7 dias a 4°C. Para longa estocagem, as amostras de urina devem ser estocadas congeladas (<-18°C).

Antes do uso, as amostras de urina devem ser sacudidas, e permitida sedimentação por no mínimo 30 minutos.

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 cavidades) revestidas previamente com streptavidina. Fornecidas em um suporte plástico.

Padrão **CAL 0**

Um frasco (min. 12.0 mL) de solução pronta para uso com estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Padrões **CAL 1 - 5**

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

Controle **CTRL 1 - 2**

Dois frascos (min. 0.4 mL) de solução di-peptide tamponada pronta para uso, com estabilizador de proteína, detergente e conservante. A concentração exata de ALPHA CrossLaps está assinalada no relatório do controlo da qualidade.

Anticorpo Biotinilado **Ab BIOTIN**

Um frasco (min. 0.2 mL) de uma solução concentrada contendo um anticorpo monoclonal biotinilado específico para produtos de degradação de teleopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo I. Preparado em uma solução tamponada com estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Anticorpo Conjugado com Peroxidase **ENZYMCONJ**

Um frasco (min. 0.25 mL) de uma solução concentrada contendo um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase, específico para produtos de degradação de teleopeptídeos C-terminais do colágeno Tipo I. Preparado em uma solução tamponada com estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Tampão para incubação **BUF**

Um frasco (min. 15.0 mL) de solução tampão pronta para uso, com estabilizador de proteína, detergente e conservante.

Solução de Substrato **SUBS TMB**

Um frasco (min. 12.0 mL) de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), pronto para uso, em um tampão ácido. Observe que o extrato cromogênico pode parecer levemente azulado.

Solução Stop **H2SO4**

Um frasco (min. 12.0 mL) de ácido sulfúrico 0,18 mol/L pronto para uso.

Tampão para Lavagem **WASHBUF 50x**

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

Fita selante

Filme adesivo 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 25-200 µL
- Água destilada ou deionizada
- Multipipeta de precisão com 8 ou 12 canais para dispensar 100 µL
- Leitor de placa ELISA com 450 nm e 650nm como referência de comprimento de onda.

PROCEDIMENTO PARA O ENSAIO

Procedimento para o ensaio

Antes da utilização, ajuste a temperatura de todas as soluções para a temperatura ambiente (18-22°C). Misture todos os reagentes e amostras antes da utilização (evite espuma).

Conduza o ensaio a 18-22°C.

Determine o número de tiras necessárias para o ensaio. É recomendado que se testem todas as amostras em duplicata. Além disso, para cada teste, um total de 16 cavidades são necessárias para os padrões e controles do kit. Coloque o número adequado de tiras no suporte plástico. Deposite as imunotiras não utilizadas na embalagem hermeticamente fechada juntamente com as cápsulas dissecantes.

1 Pre-diluição das amostras de urina

Diluir kits de controles **CTRL 1 - 2** fornecidos com o kit e diluir amostras de urina 1+7 no **Padrão 0** **CAL 0** antes do teste (e.g. 25+175 µL).

2 Preparação da Solução de Anticorpo:

ATENÇÃO: Prepare a **Solução de Anticorpo imediatamente antes** do uso. A **Solução de Anticorpo** é preparada misturando-se as Anticorpo Biotinilado **Ab BIOTIN**, Anticorpo Conjugado com Peroxidase **ENZYMCONJ** e Tampão para incubação **BUF**, na proporção volumétrica 1+1+100, em um recipiente vazio. Misture cuidadosamente e evite formação de espuma. **Prepare um nova solução antes de cada ensaio.**

3 Incubação de Uma Etapa

Pipete 25 µL de cada Padrão **CAL 0 - 5**, Controle, ou das amostras desconhecidas nas cavidades adequadas, seguidas por 100 µL de Solução de Anticorpo. Cubra as imunotiras com fita selante e incube por 60±5 minutos a 2-8°C sem sacudir.

4 Lavagem

Lave manualmente as imunotiras por 5 vezes com 300 µL **Tampão para Lavagem** (**WASHBUF 50x** diluído 1+50 em água destilada ou deionizada). Usando uma placa de lavagem automatizada, siga as instruções do fabricante ou as diretrizes do laboratório. Normalmente, 5 ciclos de lavagem são suficientes. Certifique-se de que as cavidades fique **completamente vazias** após cada ciclo manual ou automático de lavagem.

5 Incubação com solução de substrato cromogênico

Pipete 100 µL de **Solução de Substrato** **SUBS TMB** em cada cavidade e incube por 15±2 minutos a temperatura ambiente (18-22°C), no escuro, sem sacudir. Use fita selante. Não pipete diretamente do frasco contendo 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 com TMB.

6 Interrompendo a reação de desenvolvimento de cor

Pipete 100 µL de **Solução Stop** **H2SO4** em cada cavidade.

7 Medição da absorbância

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

Limitações do procedimento

Se a absorbância de uma (pre-diluída) amostra estiver acima de 5.0 ng/mL, a amostra deve ser diluída adicionalmente no **Padrão 0** e reanalisada.

CONTROLE DE QUALIDADE

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

RESULTADOS

Cálculo dos Resultados

É recomendado o uso de uma curva logística de **4 parâmetros**.

Exemplo de resultados obtidos:

Padrões Controles Amostras	Conc. de ALPHA CrossLaps (ng/mL)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs) Obs 1/ Obs 2	Média A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs)	Interpolado conc. ALPHA CrossLaps (ng/mL)	ALPHA CrossLaps Conc. corrigido por diluição x8 (ng/mL)
Padrão 0	0.00	0.008 / 0.009	0.009		
Padrão 1	0.50	0.031 / 0.029	0.030		
Padrão 2	1.12	0.145 / 0.135	0.140		
Padrão 3	3.22	0.929 / 0.873	0.901		
Padrão 4	4.59	1.534 / 1.350	1.442		
Padrão 5	5.92	1.975 / 1.888	1.932		
Controle 1		0.655 / 0.535	0.595	2.49	19.9
Controle 2		1.170 / 1.146	1.158	3.86	30.9
Amostra I		0.569 / 0.600	0.585	2.03	16.2
Amostra II		0.293 / 0.285	0.289	1.23	9.84
Amostra III		0.159 / 0.155	0.157	0.66	5.26

Observação:

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

Cálculo do valor ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA corrigido

Para cada amostra de urina a concentração de ALPHA CrossLaps (ng/mL) e a concentração de creatinina (mM= mmol/L) devem ser determinadas utilizando um método colorimétrico enzimático para analisadores químico-clínicos (p.ex. CREA plus para analisadores Roche/Hitachi) ou equivalente.

A seguinte equação corrige a concentração de ALPHA CrossLaps por variação na concentração da urina:
ALPHA CrossLaps (ng/mL)

Valor ALPHA CrossLaps corrigido (µg/mmol) =

Creatinine (mmol/L)

Características de desempenho

Limite de detecção: 0.80 ng/mL ALPHA CrossLaps

Esta é a concentração correspondente a três desvios padrões acima da média de 21 determinações do Branco (Padrão 0) multiplicado pelo fator de diluição 8.

Precisão

A precisão do ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA foi avaliada para três amostras de urina. Os resultados são apresentados na tabela abaixo (os resultados não foram corrigidos por fator de diluição)

Variação Inter-Ensaio (n=10)

Média (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5.21	0.30	5.8
3.19	0.17	5.3
1.15	0.11	9.4

Variação Intra-Ensaio (n=10)

Média (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5.21	0.07	1.4
3.19	0.07	2.3
1.15	0.02	2.0

Diluição/Linearidade

O ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA é linear na faixa de 0.10 ng/mL a 5.00 ng/mL (antes da correção da diluição) do ALPHA CrossLaps.

As amostras de urina com concentração de 6.32-13.36 (corrigido para diluição) foram diluídas no **Padrão 0** e a concentração de ALPHA CrossLaps foi determinada com ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA. A amostra pura de urina está ajustada para 100%

Diluição	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3		
Amostra vs diluente	Obs. (ng/mL)	Esp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Esp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Esp. (ng/mL)	RC (%)
Neat	0.79	0.79	100	1.67	1.67	100	1.16	1.16	100
1+1	0.38	0.39	97	1.00	0.83	120	0.59	0.58	102
1+3	0.19	0.20	97	0.49	0.42	117	0.28	0.29	98
1+8	0.10	0.10	104	0.21	0.21	100	0.14	0.14	96

Obs.: Observado, Esp.: Esperado, RC: Recuperação.

Interferência:

A ser determinada.

Valores Esperados

É aconselhável que um laboratório estabeleça sua própria faixa de valores normais e patológicos. Como exemplo, os valores médios e o CI 95% para várias populações estão listados abaixo. Para maiores informações, consulte a lista de referências. Todas as amostras foram coletadas pela manhã, após jejum, em indivíduos saudáveis

População	Número de sujeitos (n)	Idade (Anos)	Valores Gemoétricos Médios (µg/mmoL)	95% CI
Mulheres antes da menopausa	81	32-49	0.32	0.10 – 0.99
Mulheres após a menopausa	320	43-75	0.62	0.17 – 2.26
Homens	209	30-87	0.38	0.13 – 1.13

INTRODUKTION

Anbefalet anvendelse

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA er et enzym-baseret immunoassay for kvantitativ bestemmelse af ikke-isomerede fragmenter af C-terminalt telopeptid fra type I kollagen (α CTX-I) i humant urin.

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA er til brug som en indikator for nedbrydning af ikke-isomeret knogle kollagen og kan bruges som en hjælp ved bestemmelse af knoglemetastaser hos patienter med bryst- og prostatakraft.

Desuden, kan ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA bruges til hjælp ved diagnostisering af Pagets sygdom og ved monitorering af anti-resorptiv behandling hos patienter med Pagets sygdom.

Begrænsninger

Brug af testen til bestemmelse af knoglenedbrydningen kan ikke anbefales.

Sammendrag

Type I kollagen udgør mere end 90% af den organiske matrix i knoglen og produceres primært i knogle. Under fornyelse af knoglevæv nedbrydes type I kollagen og små kollagen fragmenter udskilles i urinen. Disse fragmenter kan måles med ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA. Forskellige artikler har beskrevet målinger af specifikke nedbrydningsprodukter af type I kollagen (ALPHA CrossLaps) i humant urin som nyttig ved vurdering af knoglenedbrydningen ved Pagets sygdom (1) og ved opdagelse af knoglemetastaser ved prostata- (2,5) og brystkræft (3,4,5,6).

Test procedure, kortfattet

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA bygger på et højt specifikt monoklonalt antistof rettet mod aminosyre sekvensen EKAHDGGR. For at få et specifikt signal i ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA kræves der to krydsbundne EKAHDGGR kæder.

Standarder, kontroller og urin prøver pipetteres i mikrotiterbrøndene, der er dækket med streptavidin, hvorefter der tilsættes en blanding af det biotinylerede og det peroxidase-mærkede antistof. Et kompleks dannes mellem ALPHA CrossLaps antigenet, biotinylerede antistof og det peroxidase-mærkede antistof, og dette kompleks binder sig til streptavidin –overfladen via det biotinylerede antistof. Efter inkubation ved 2-8°C, tømmer brøndene og vaskes. Et 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 ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA 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

For optimale resultater anbefales det at anvende anden morgenurinprøve fra fastende personer. Urinprøverne er stabile i 7 dage ved 4°C. For længere opbevaring anbefales det at nedfryse urinprøverne ved (<-18°C).

Før brug, skal urinprøver omrystes og bundfældes i minimum 30 minutter.

Medfølgende materialer

Før kittet tages ibrug bør afsnittet **Forholdsregler** læses. Kittet indeholder tilstrækkelig reagenser til 96 bestemmelser.

Streptavidin dækkede mikrotiter plader **MICROPLAT**

Mikrobrønde (12x8 brønde) overfladebehandlet med streptavidin. Leveres i en plastik ramme.

Standard **CAL 0**

En flaske (min. 12.0 mL) med klar-til-brug opløsning med stabilisator, detergent og konserveringsmiddel.

Standarder **CAL 1 - 5**

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

Kontroller **CTRL 1 - 2**

To flasker (min. 0.4 mL) med klar-til-brug di-peptid i buffer med stabilisator, detergent og konserveringsmiddel. Koncentrationen af ALPHA CrossLaps i kontrollen er angivet på medfølgende Kvalitetskontrolrapport.

Biotinuleret antistof **Ab BIOTIN**

En flaske (min. 0.20mL) med en koncentreret opløsning af biotinyleret, murint monoklonalt antistof, der er specifikt for nedbrydningsprodukter fra C-terminalt telopeptid fra type I kollagen. Opløsningen er i en buffer med stabilisator, detergent og konserveringsmiddel.

Peroxidase Conjugeret antistof **ENZYMCNJ**

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

Inkubations Buffer **BUF**

En flaske (min. 15.0 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 **H2SO4**

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.

Forseglingstape

Forseglingstape til at dække brøndene under inkubationerne.

Nødvendige materialer – ikke medfølgende

- Beholdere til at fremstilling af Antistof Opløsning og Vaske Opløsning.
- Mikropipetter til at afpipettere 25-200 µL.
- Destilleret vand.
- 8- eller 12-kanals multipipetter til at afpipettere 100 µL
- ELISA plade læser med 450 nm og 650 nm bølgelængde

TEST PROCEDURE

Test procedure

Ryst alle reagenser og prøver inden brug, idet skumdannelse dog bør undgås.

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-kontrol for hver analyse kørsel. Placer det ønskede antal immunostrips i plastik rammen. Ubenyttede immunostrips opbevares i den tillukkede folie pose med en fugtabsorberende kapsel.

1 For-fortynding af urinprøver og kontroller

Fortynd kittets kontroller **CTRL 1 - 2** og urinprøver 1+7 i standard 0 **CAL 0** inden udførelse af testen (25+175µl).

2 Fremstilling af Antistof Opløsning

BEMÆRK: Antistof Opløsningen skal fremstilles umiddelbart inden anvendelse. Antistof Opløsning fremstilles ved at blande Biotinyleret Antistof **Ab BIOTIN**, Peroxidase Konjugeret Antistof **ENZYMCONJ** 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 af testen

3 Inkubation med Antistof Opløsning

Pipetter 25 µL af enten Standard **CAL 0 - 5** Kontrol eller ukendte prøver i de respektive brønde efterfulgt af 100 µL Antistof Opløsning. Tildæk brøndene med forseglningstape og inkuber i 60+5 minutter ved 2-8°C uden at ryste.

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 TMB** i hver brønd og inkuber 15+2 minutter ved stuetemperatur (18-22°C) i mørke uden at ryste. 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 tilbageføres til flaske TMB.

6 Stop af farve reaktion

Pipetter 100 µL af Stop Opløsning **H2SO4** 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 af (for-fortyndet) prøve overstiger den højeste standard, bør prøven fortyndes yderligere i Standard 0 og måles igen.

KVALITETS KONTROL

"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

IDet anbefales at bruge 4-parameters kurve fit.

Eksempel på beregning af resultater

Standarder/ Kontroller/ Prøver	ALPHA CrossLaps conc. (ng/mL)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs) Obs 1/ Obs 2	Mean A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs)	ALPHA CrossLaps Interpoleret conc. (ng/mL)	ALPHA CTX Conc. korrigeret for fortynding x8 (ng/mL)
Standard 0	0.00	0.008 / 0.009	0.009		
Standard 1	0.50	0.031 / 0.029	0.030		
Standard 2	1.12	0.145 / 0.135	0.140		
Standard 3	3.22	0.929 / 0.873	0.901		
Standard 4	4.59	1.534 / 1.350	1.442		
Standard 5	5.92	1.975 / 1.888	1.932		
Control 1		0.655 / 0.535	0.595	2.49	19.9
Control 2		1.170 / 1.146	1.158	3.86	30.9
Sample I		0.569 / 0.600	0.585	2.03	16.2
Sample II		0.293 / 0.285	0.289	1.23	9.84
Sample III		0.159 / 0.155	0.157	0.66	5.26

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

Beregning af korrigeret ALPHA CrossLaps værdi

For alle urinprøver skal både bestemmes ALPHA CrossLaps koncentration (ng/mL) og kreatinin koncentration (mM=mmol/L). Sidstnævnte kan bestemmes ved hjælp af en enzymatisk kolometrisk metode ved anvendelse af kliniske kemiske analyseapparater (f.eks. CREA plus af Roche/Hitachi analyseapparater) eller lignede apparat.

Følgende ligning korrigerer ALPHA CrossLaps koncentration for kreatinin koncentration i urin::

$$\text{Korrigeret ALPHA CrossLaps værdi (mg/mmol)} = \frac{\text{ALPHA CrossLaps (ng/mL)}}{\text{Creatinine (mmol/L)}}$$

Test specifikationer

Detektionsgrænse: 0.80 ng/mL ALPHA CrossLaps

Denne koncentration svarer til tre absorbans standardafvigelse over middelværdien beregnet på basis af 21 bestemmelser af standard 0 (ganget med fortyndingsfaktor 8).

Præcision

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

Interassay variation (n=10)

Interassay variation (n=10)

Gennemsnit (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)		Gennemsnit (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5,21	0,30	5,8		5,21	0,07	1,4
3,19	0,17	5,3		3,19	0,07	2,3
1,15	0,11	9,4		1,15	0,02	2,0

Linearitet

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA er lineær i området 0.10 ng/mL til 5.00 ng/mL (inden korrigeret af fortynding) af ALPHA CrossLaps.

Urinprøver med koncentration på 6.32-13.36 blev fortyndet med Standard 0 og koncentrationen blev efterfølgende målt i ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA . Den ufortyndede urinprøve blev sat til 100% neat

sample is set to 100%.

Dilution	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
Sample vs. diluent	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)
Neat	0.79	0.79	100	1.67	1.67	100	1.16	1.16	100
1+1	0.38	0.39	97	1.00	0.83	120	0.59	0.58	102
1+3	0.19	0.20	97	0.49	0.42	117	0.28	0.29	98
1+8	0.10	0.10	104	0.21	0.21	100	0.14	0.14	96

Obs.: Observed(observeret), Exp.: Expected(forventet), RC: Recovered(opnået).

Interference:

To be determined.

Reference værdier

Det anbefales at laboratorier selv etablerer normale og patologiske reference værdier. Som et eksempel er der nedenfor angivet middelværdi og standardafvigelse for forskellige populationer. Alle prøver blev taget som morgen, faste prøver fra raske individer

Populationer	Antal personer (n)	Alder (År)	Geometrisk gennemsnit (µg/mmoL)	95% CI
Pre-menopausal women	81	32-49	0.32	0.10 – 0.99
Post-menopausal women	320	43-75	0.62	0.17 – 2.26
Males	209	30-87	0.38	0.13 – 1.13

INTRODUKTION

Avsett bruk

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA är en enzymimmunologisk metod för kvantifiering av icke-isomeriserat fragment av c-terminal telopeptid från kollagen typ I (CrossLaps-I) i urin från människa.

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA är avsett för att indikera nedbrytning av icke-isomeriserat benkollagen och kan användas som hjälp vid identifiering av skelettmetastaser hos patienter med bröst- eller prostatacancer.

Dessutom kan ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA användas som stöd vid diagnos av Paget's sjukdom och vid monitorering av anti-resorptionsterapi vid Paget's sjukdom.

Begränsningar

Användningen av detta test har inte blivit fastställt för kvantifiering av benresorptionsnivån.

Sammanfattning och förklaring av testet

Kollagen typ I svarar för mer än 90% av det organiska materialet i benmatrisen och syntetiseras primärt i ben. Vid förnyelse av skelettvävnad bryts kollagen typ I ner och små peptider utsöndras i urinen. Dessa peptider kan mätas med ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA. Kvantifiering av vissa fragment av kollagen typ I (ALPHA CrossLaps) i human urin har rapporterats som användbart vid uppskattning av benresorption vid Paget's sjukdom (1) och för påvisande av benmetastaser vid prostata- (2, 5) och bröstcancer (3, 4, 5, 6).

Principen för analysproceduren

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA baseras på en specifik monoklonal antikropp mot aminosyrasekvensen EKAHDGGR. För att få ett positivt svar med ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA, måste två av kedjorna EKAHDGGR vara korslänkade.

Standarder, kontroller och urinprover pipetteras ner i avsedda brunnar på mikrotiterplattan vilka är förbehandlade med streptavidin. Därefter appliceras en blandning av biotiniserad antikropp och peroxidaskonjugerad antikropp. Det formas då ett komplex mellan ALPHA CrossLaps antigenet, den biotiniserade antikroppen och den peroxidaskonjugerade antikroppen. Detta komplex binds till den streptavidinbehandlade ytan i brunnen via den biotiniserade antikroppen. Efter inkubation vid 2-8°C tömmas och sköljes brunnarna noggrant. Ett kromogent substrat tillsättes och färgreaktionen stoppas med svavelsyra. Slutligen mäts absorbansen.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Följande försiktighetsåtgärder skall iakttas i laboratoriet:

- Undvik att äta, dricka, röka eller sminka dig i utrymmen där du hanterar immunodiagnostiskt material.
- Pipettera inte med munnen.
- Använd handskar när du hanterar immunodiagnostiskt material och tvätta händerna noga efteråt.
- Täck arbetsytan med underläggspapper för engångsbruk.

Varning

Endast för användning in vitro.

- Alla reagens och laboratorieutrustning skall hanteras och kasseras som om de vore infekterade.
- Använd inte komponenter efter passerat utgångsdatum och blanda inte material från olika batcher.

Förvaring

förvara ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA direkt efter leverans vid 2-8°C. Under dessa förhållanden är kittet hållbart till utgångsdatum på förpackningen.

MATERIAL

Insamling av prov

Vi rekommenderar användning av andra morgonurinkastningen från fastande individer.
Urinprover är stabila i 7 dagar vid 4°C. För längre förvaring bör proverna frysas vid < -18°C.
Före användning skall urinproverna skakas och låtas sedimentera i minst 30 minuter.

Ingående material

Innan du öppnar och använder materialet bör du läsa igenom avsnittet Försiktighetsåtgärder. Förpackningen innehåller material för 96 bestämningar.

Streptavidinbehandlad mikrotiterplatta **MICROPLAT**

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

Standard **CAL 0**

En vial (min. 12.0 mL) med bruksfärdig lösning av proteinstabilisator, vätsmedel och konserveringsmedel.

Standarder **CAL 1 - 5**

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

Kontroll **CTRL 1 - 2**

Två vialer (min. 0.4 mL) med bruksfärdig di-peptid i en buffrad lösning med proteinstabilisator, vätsmedel och konserveringsmedel. Den exakta koncentrationen ALPHA CrossLaps är tryckt på Kvalitetskontrollrapport.

Biotiniserad antikropp **Ab BIOTIN**

En vial (min. 0.2 mL) med en koncentrerad lösning av biotiniserad monoklonal murin antikropp specifik för nedbrytningsprodukter av C-terminal telopeptid från kollagen typ I. Beredd i en buffrad lösning med proteinstabilisator, vätsmedel och konserveringsmedel.

Peroxidaskonjugerad antikropp **ENZYMCONJ**

En vial (min. 0.25 mL) med koncentrerad lösning av peroxidaskonjugerad murin monoklonal antikropp specifik för nedbrytningsprodukter av C-terminal telopeptid från kollagen typ I. Beredd i en buffrad lösning med proteinstabilisator, vätsmedel och konserveringsmedel.

Inkubationsbuffert **BUF**

En vial (min. 15.0 mL) med bruksfärdig buffertlösning med proteinstabilisator, vätsmedel och konserveringsmedel.

Substratlösning **SUBS TMB**

En vial (min. 12.0 mL) med bruksfärdigt substrat av tetrametylbendidin (TMB) i sur buffert.
Notera att det kromogena substratet kan vara en aning blåfärgat.

Stopplösning **H2SO4**

En vial (min. 12.0 mL) med bruksfärdig svavelsyra (0,18 mol/l).

Tvättbuffert **WASHBUF 50x**

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

Förseglingstejp

Självhäftande film att täcka brunnarna med under inkubationen.

Övrig utrustning som inte ingår

- Behållare för beredning av antikroppslösning och tvättbuffertlösning
- Autopipetter för presisionsdispensering i intervallet 25-200 µL
- Destillerat eller avjoniserat vatten
- En 8- eller 12-kanals multipipett för 100 µL
- En ELISA-plattläsare med våglängden 450 nm samt 650 nm som referens

ANALYSPROCEDUR

Förbered alla lösningar och låt dem anta rumstemperatur (18-22°C). Blanda till alla reagens och prov (undvik skum). **Utför analysen vid 18-22°C.**

Plocka fram så många strips som du behöver. Det rekommenderas att alla prover körs i duplikat. Utöver dessa behövs 16 brunnar för kontroller och standarder. Placera stripsen du ska använda i plastramen. Förvara oanvända immunostrips i foliepåsen, väl försluten, med torkmedel.

1 Spädning av urinprover

Blanda en del av de medföljande kontrollerna **CTRL 1 – 2** med 7 delar **Standard 0** **CAL 0** före användning (t.ex. 25+175 µL). Gör samma sak med urinproverna (1+7).

2 Beredning av antikroppslösning:

OBSERVERA: Bered antikroppslösningen **strax före användning**. Antikroppslösningen bereds genom att blanda Biotiniserad antikropp **Ab BIOTIN**, Peroxidaskonjugerad antikropp **ENZYMCONJ** och Inkubationsbuffert **BUF** i volymförhållande 1+1+100 i en tom behållare. Blanda noga och undvik skumbildning. **Blanda färsk lösning före varje analysomgång.**

3 Inkubation i ett steg

Pipettera 25 µL av vardera **standard** **CAL 0 - 5** **kontroll**, eller okänt **prov** i respektive brunn följt av 100 µL **antikroppslösning**. Täck stripsen med förseglingstejp och inkubera i **60±5 minutes vid 2-8°C** utan skakning.

4 Sköljning

Skölj stripsen manuellt 5 gånger med 300 µL **tvättbuffert** (**WASHBUF 50x**) spädd 1+50 i destillerat eller avjoniserat vatten). Om du använder en automatisk plattvätt, följ tillverkarens instruktioner eller egna rekommendationer på laboratoriet. Vanligen räcker det med 5 omgångar. Kontrollera noga att brunnarna är **fullständigt tomma** efter varje manuell eller automatisk tvättomgång.

5 Inkubation med kromogen substratlösning

Pipettera 100 µL **substratlösning** **SUBS TMB** i varje brunn och inkubera i 15±2 minuter vid rumstemperatur (18-22°C) i mörker utan skakning. Använd förseglingstejp. Pipettera inte direkt från vialen med TMB-substrat utan överför den mängd du behöver till ett rent kärl. Kvarvarande substrat efter dispensering skall **kasseras** och **inte** hållas tillbaka i TMB-vialen.

6 Stoppa färgreaktionen

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

7 Absorbansmätning

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

Begränsningar

Om absorbansen hos ett (förtunnat) prov ger ett värde över 5.0 ng/mL bör det spädas ytterligare med **Standard 0** och analyseras på nytt.

KVALLITETSKONTROLL

Good Laboratory Practice (GLP) kräver att man använder prover för kvalitetskontroll vid varje analysomgång för att kunna validera analysresultatet. Kontroller skall behandlas som okända prover och resultatet skall analyseras med relevanta statistiska metoder.

RESULTAT

Beräkning av resultat

Vi rekommenderar användning av kurvanpassning med **4-parametrar**.

Exempel på resultat:

Standarder Kontroller Prov	ALPHA CrossLaps konc. (ng/mL)	A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs) Obs 1/ Obs 2	Medelv A ₄₅₀₋₆₅₀ (Abs)	ALPHA CrossLaps interpolerad konc. (ng/mL)	ALPHA CrossLaps konc. korrigerad för spädning x8 (ng/mL)
Standard 0	0,00	0,008 / 0,009	0,009		
Standard 1	0,50	0,031 / 0,029	0,030		
Standard 2	1,12	0,145 / 0,135	0,140		
Standard 3	3,22	0,929 / 0,873	0,901		
Standard 4	4,59	1,534 / 1,350	1,442		
Standard 5	5,92	1,975 / 1,888	1,932		
Control 1		0,655 / 0,535	0,595	2,49	19,9
Control 2		1,170 / 1,146	1,158	3,86	30,9
Sample I		0,569 / 0,600	0,585	2,03	16,2
Sample II		0,293 / 0,285	0,289	1,23	9,84
Sample III		0,159 / 0,155	0,157	0,66	5,26

OBS:

Tabellen ovan är bara ett exempel för att illustrera principen och skall inte användas vid någon analys

Beräkning av korrigerat ALPHA CrossLaps-värde

För varje urinprov måste ALPHA CrossLaps koncentrationen (ng/mL) korrigeras mot koncentrationen av kreatinin (mM = mmol/L). Kreatininkoncentrationen bör bestämmas med analysinstrument för klinisk kemi genom en kolorimetrisk enzymatisk metod (t.ex. CREA plus för Roche/Hitachi analysers) eller motsvarande.

Använd följande ekvation för att korrigera ALPHA CrossLaps-koncentrationen mot variation i urin koncentration:

ALPHA CrossLaps (ng/mL)

Korr. ALPHA CrossLaps-värde (µg/mmol) =

Kreatinin (mmol/L)

Tekniska data

Detektionsgräns: 0.80 ng/mL ALPHA CrossLaps

Detta är den koncentration som motsvarar tre standardavvikelser (SD) över medelvärdet av 21 mätningar av ett blankprov (Standard 0) multiplicerat med spädningsfaktor 8.

Presicion

Presicionen hos ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA utvärderades med hjälp av tre urinprover. Resultatet sammanfattas i tabellen nedan (värdena har inte korrigerats med avseende på spädning).

InterAssay Variation (n=10)

IntraAssay Variation (n=10)

Medelvärde (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)		Medelvärde (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV (%)
5,21	0,30	5,8		5,21	0,07	1,4
3,19	0,17	5,3		3,19	0,07	2,3
1,15	0,11	9,4		1,15	0,02	2,0

Spädning/Lineäritet

ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA ger värden av ALPHA CrossLaps som är linjära i intervallet 0.10 ng/mL till 5.00 ng/mL (före spädningskorrigering).

Urinprover med ett värde i intervallet 6.32-13.36 ng/mL (korrigerat för spädning) späddes med **Standard 0** och koncentrationen av ALPHA CrossLaps bestämdes med ALPHA CrossLaps® (CTX-I) EIA. Som referens sattes det utspädda provet till 100%

Spädning	Prov 1			Prov 2			Prov 3		
prov + diluent	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)	Obs. (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	RC (%)
Outspätt	0.79	0.79	100	1.67	1.67	100	1.16	1.16	100
1+1	0.38	0.39	97	1.00	0.83	120	0.59	0.58	102
1+3	0.19	0.20	97	0.49	0.42	117	0.28	0.29	98
1+8	0.10	0.10	104	0.21	0.21	100	0.14	0.14	96

Obs.: Observerat, Exp.: Förväntat, RC: Recovery.

Interferens:

Ännu ej fastställt.

Förväntade värden

Det är bra att man på laboratoriet fastställer sina egna normala och patologiska gränsvärden.

Som exempel ges nedan medelvärden och 95% konfidensintervall (KI) för några populationer. Alla prover kommer från fastande morgonurin hos friska individer. Se avsnittet Referenser för vidare läsning

Populations	Antal individer (n)	Ålder (år)	Geometriskt medelvärde (µg/mmol)	95% KI
Pre-menopausala kvinnor	81	32-49	0.32	0.10 – 0.99
Post-menopausala kvinnor	320	43-75	0.62	0.17 – 2.26
Män	209	30-87	0.38	0.13 – 1.13

REFERENCES

- Alexandersen et al. Non-Isomerized C-Telopeptide fragments are highly sensitive markers for monitoring disease activity and treatment efficacy in Paget's disease of bone.
- Cloos et al. Investigation of bone diseases using isomerised and racemised fragments of type I collagen. Calcif Tissue Int (2003);72:8-17.
- Cloos et al. Breast cancer patients with bone metastases are characterised by increasing levels of nonisomerised type I collagen fragments. Breast Cancer Res (2003);5:R103-9.
- Cloos et al. An immunoassay for measuring fragments of newly synthesized collagen type I produced during metastatic invasion of bone. Clin. Lab. (2004); 50:279-289.
- Leeming DJ, Koizumi M, Byrjalsen I, Li B, Qvist P, Tanko LB: The relative use of eight collagenous and noncollagenous markers for diagnosis of skeletal metastases in breast, prostate, or lung cancer patients. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15: 32-8, 2006
- Leeming DJ, Dellling G, Koizumi M, Henriksen K, Karsdal MA, Li B, Qvist P, Tanko LB, Byrjalsen I: Alpha CTX as a biomarker of skeletal invasion of breast cancer: immunolocalization and the load dependency of urinary excretion. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15: 1392-5, 2006

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



Immunodiagnostic Systems Limited.

UK Immunodiagnostic Systems Limited, 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK

Tel: +44 (0) 191 519 0660 • Fax: +44 (0) 191 519 0760 • e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

USA Immunodiagnostic Systems (IDS) Inc, 948 Clopper Road, Gaithersburg, MD 20878, USA

Tel: +1(877)852-6210 • Fax: +1 (301)990-4236 • e-mail: info.us@idsplc.com • www.idsplc.com

Germany Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH), Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main

Tel: +49 (0) 69 3085-5025 • Fax: +49 (0) 69 3085-5125 • e-mail: info.de@idsplc.com • www.idsplc.com

France Immunodiagnostic Systems France SA (IDS France SA) 153 Avenue D'Italie, 75013 PARIS

Tel: +33 (0)1 40 77 04 50 • Fax: +33 (0)1 40 77 04 55 • e-mail: info.fr@idsplc.com • www.idsplc.com

Scandinavia Immunodiagnostic Systems Nordic a/s (IDS Nordic a/s), International House, Center Boulevard 5, 2300 København S, Denmark

Tel: +45 44 84 0091 e-mail: info.nordic@idsplc.com • www.idsplc.com