

OSTEOMARK[®] NTx Serum

Osteomark NTx Serum dient zur quantitativen Bestimmung quervernetzter N-Telopeptide aus Kollagen Typ I (NTx) in Humanserum als Indikator der Knochenresorption.

REF 9021

Nur zur professionellen *In-vitro*-Diagnostik.

Indikationen

Die Bestimmung des NTx-Serumspiegels dient als Hilfsmittel zur Vorhersage der skeletalen Reaktion (Knochenmineraldichte) auf anti-resorptive Therapie sowie zur Überwachung von Änderungen in der Knochenresorption nach Beginn einer anti-resorptiven Therapie. Vor der Einleitung einer anti-resorptiven Therapie wird anhand des NTx-Serumspiegels die Wahrscheinlichkeit einer Abnahme der Knochenmineraldichte (BMD) bei Frauen in der Menopause nach einem Jahr Behandlung mit einer anti-resorptiven Hormontherapie gegenüber Frauen, die mit einer Calcium-Supplementierung behandelt wurden, beurteilt.

Der Messbereich von Osteomark NTx Serum liegt zwischen 3,2 und 40,0 nM Knochenkollagenäquivalente (BCE).

Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Die Knochen von Säugetieren unterliegen kontinuierlichen Veränderungen durch den gekoppelten Prozess aus Knochenresorption durch Osteoklasten mit anschließender Knochenneubildung durch Osteoblasten. Dieser Vorgang ist erforderlich für eine normale Entwicklung und Aufrechterhaltung des Skeletts. Abnormalitäten in diesen eng miteinander gekoppelten Prozessen führen häufig zu Veränderungen von Skelettmasse und -form. Die Bestimmung spezifischer Abbauprodukte der Knochenmatrix liefert analytische Daten zur Rate des Knochenmetabolismus. Etwa 90 % der organischen Knorpelmatrix bestehen aus Kollagen Typ I. Kollagen Typ I ist ein helikales, an den N- und C-terminalen Enden des Moleküls quervernetztes Protein, das den Grundbaustein des Knorpelgewebes darstellt und für dessen Zugfestigkeit verantwortlich ist.

Durch die Entdeckung quervernetzter N-Telopeptide aus Kollagen Typ I (NTx) steht ein spezifischer biochemischer Messparameter für die Humanknochenresorption zur Verfügung, der in einem Immunoassay bestimmt werden kann. Aufgrund seiner besonderen Aminosäuresequenz und Ausrichtung der quervernetzten alpha-2(I) N-Telopeptide ist das NTx-Molekül knorpelspezifisch. Für die Bildung des NTx-Moleküls in Knochen sind die Osteoklasten verantwortlich. Es findet sich als stabiles Endbauprodukt in Urin und Serum.

Osteomark NTx Serum ermöglicht eine quantitative Bestimmung von NTx in Serum als Indikator für die Humanknochenresorption. Hohe NTx-Konzentrationen des Serums zeigen eine hohe Knochenresorption an.^{1,2,3,4} Aus klinischen Studien ist bekannt, dass eine hohe Knochenresorptionsrate die Hauptursache des altersbedingten Knochenverlustes darstellt und eine niedrige Knochenmasse nicht nur oft zu Osteopenie führt, sondern auch Hauptursache der Osteoporose ist.^{5,6} Durch Osteoporose begünstigte Frakturen sind bei älteren Frauen der Hauptgrund für eine höhere Morbidität und Mortalität.

An acht klinischen Standorten in den USA wurde eine randomisierte Studie mit Frauen in der Menopause durchgeführt. Die Studienteilnehmerinnen wurden randomisiert entweder einer Hormonsubstitutionstherapie (HST) plus Calcium-Supplementierung (500 mg täglich) oder der Behandlung mit ausschließlicher Calcium-Supplementierung zugeordnet.⁷ Im Verlauf der Studie entnommene Serumproben wurden mit dem Osteomark NTx-Serumassay untersucht. Die Ergebnisse unterstützen die Eignung von Osteomark NTx Serum zur Überwachung der anti-resorptiven Wirkung der Therapie und zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer Abnahme der Knochendichte nach einem Jahr ausbleibender Hormonbehandlung.

In einem spezialisierten Kreiskrankenhaus wurde eine randomisierte klinische Doppelblindstudie bei Frauen in der Postmenopause mit niedriger Knochenmasse bzw. diagnostizierter Osteoporose durchgeführt. Die Patientinnen wurden randomisiert entweder der Placebogruppe oder einer Gruppe zugeordnet, die mit 5–10 mg Natriumalendronat behandelt wurde.⁸ Im Verlauf der Studie entnommene Serumproben wurden mit dem Osteomark NTx-Serumassay untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Eignung von Osteomark NTx Serum zur Überwachung der anti-resorptiven Wirkung der Therapie und zur Vorhersage ihres Einflusses auf die Knochendichte anhand frühzeitig erkannter Veränderungen im NTx-Serumspiegel.

Grundlagen des Assays

Osteomark NTx Serum ist ein Enzym-Immunoassay auf Basis des ELISA-Verfahrens (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) mit kompetitiver Inhibition zur quantitativen Bestimmung von NTx in Humanserum.

NTx-Epitop wird auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen adsorbiert. Die verdünnten Proben werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und anschließend mit monoklonalen, mit Meerrettichperoxidase markierten Antikörpern

versetzt. In der Patientenprobe vorhandenes NTx konkurriert dabei mit dem NTx-Epitop in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten um Antikörperbindungsstellen. Nach einer Waschphase wird die Menge markierter gebundener Antikörper kolorimetrisch anhand der Bildung eines Peroxidsubstrats bestimmt. Die Extinktion wird spektrophotometrisch gemessen, und die NTx-Konzentration wird über eine Standardkalibrierungskurve berechnet. Die Assaywerte werden in Nanomol Knochenkollagenäquivalente pro Liter (nM BCE) angegeben.

Komponenten des Testsatzes

Gelieferte Materialien, ausreichend für 96 Vertiefungen

	Gebrauchsanweisung	1 Broschüre
A	Platte mit 96 antigenbeschichteten Vertiefungen, 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen	1 Platte
B	Proben-Diluent	40-ml-Flasche
C	Antikörperkonjugat-Konzentrat	0,4-ml-Fläschchen
D	Antikörperkonjugat-Diluent	25-ml-Flasche
E	Chromogen-Reagenz	0,9-ml-Fläschchen
F	Gepuffertes Substrat	30-ml-Flasche
G	Stopp-Reagenz	25-ml-Flasche
H	30-faches Waschkonzentrat	125-ml-Flasche
0	0 nM BCE-Kalibrator	20-ml-Fläschchen
5	5 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
10	10 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
20	20 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
40	40 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
I	Serumkontrolle Stufe I	0,4-ml-Fläschchen
II	Serumkontrolle Stufe II	0,4-ml-Fläschchen
	Plattenabdeckung	1 Block

Beschreibung der Komponenten

PLATE

Platte mit 96 antigenbeschichteten Vertiefungen 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen Die Streifen mit Mikrovertiefungen sind mit adsorbiertem, synthetischem NTx-Antigen beschichtet.

DILSPE

Proben-Diluent, 1 Flasche. Gepuffertes Reagenz zum Verdünnen der Kalibratoren, Kontrollen und Proben. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel.

CONJ

Antikörperkonjugat-Konzentrat, 1 Fläschchen. Gereinigtes monoklonale Maus-Antikörper gegen NTx, mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel. Als 100-faches Konzentrat geliefert.

CONJ DIL

Antikörperkonjugat-Diluent, 1 Flasche. Gepuffertes Reagenz zum Verdünnen des Antikörperkonjugat-Konzentrats. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel.

WASHBUF 30x

30-faches Waschkonzentrat, 1 Flasche. Ionische Detergenz-Lösung. Als 30-faches Konzentrat geliefert. (125 ml)

CHROMOGEN

Chromogen-Reagenz, 1 Fläschchen. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid. Als 100-faches Konzentrat geliefert.

BUFFER

Gepuffertes Substrat, 1 Flasche. Gepuffertes Wasserstoffperoxid zum Verdünnen des Chromogen-Reagenzes.

SOLN STOP

Stopp-Reagenz, 1 Flasche. 1N Schwefelsäure.

CAL xx nM

Testkalibratoren: Testkalibratoren: 0, 5, 10, 20, 40 nM BCE, je 1 Fläschchen. Gereinigtes NTx-Antigen in stabilisiertem Protein-Diluent. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel.

CONTROL xx

Serumkontrollen Stufe I und Stufe II, je 1 Fläschchen. Humanserum mit bekannter NTx-Konzentration. Mit ProClin™ 300 (0,10 %) als Konservierungsmittel.

PLATE Sealers

Plattenabdeckung aus Kunststoff, 1 Block.

Lagerung der Reagenzien

Die Reagenzien müssen bei 2–8 °C gelagert werden, wenn sie nicht verwendet werden. Die Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien dürfen keinen Temperaturen über 25 °C ausgesetzt werden. Verdünnte Waschlösung kann bei Raumtemperatur bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

- Ein- und Mehrkanal-Präzisionspipetten
- Einweg-Pipettenspitzen. (Im Laufe des Assayverfahrens muss zur Zugabe jeder neuen Probe und jedes neuen Reagenzes eine neue Pipettenspitze verwendet werden.)

- Mikroröhrchen oder ähnliche Behältnisse zur Herstellung von Verdünnungen
- Einweg-Kunststoffbehälter zur Herstellung der Konjugat- und Chromogen-Lösungen
- Reagenzienbehälter
- Waschautomat für Mikrotiterstreifen
- Plattenleser mit 450-nm- und 630-nm-Filtern für die Mikrovertiefungen bzw. Mikrostreifen
- Software zur Berechnung der Ergebnisse über eine 4-Parameter-Logikkurven-Anpassungsgleichung
- Deionisiertes Wasser

Probengewinnung und -lagerung

Für Osteomark NTx Serum wird das über eine Standard-Venenpunktion erhaltene Humanserum verwendet. Die Verwendung von Plasmaproben wurde nicht untersucht. Das Blut vollständig gerinnen lassen und anschließend das Serum umgehend von den roten Blutkörperchen trennen. In Serumentrennröhrchen gesammelte Proben sollten vom Gel getrennt werden. Die Serumproben können kühl (2–8 °C) bis zu 24 Stunden bzw. tiefgefroren (–20 °C oder darunter) für längere Zeit gelagert werden. Die Proben dürfen bis zu dreimal aufgetaut und wieder eingefroren werden.

Zur Therapieüberwachung sollten kurz vor oder am Tag der Therapieaufnahme Nulllinienproben gesammelt werden. Spätere Vergleichsproben sollten stets zur gleichen Tageszeit wie die Nulllinienproben entnommen werden.

Warn- und Vorsichtsmaßnahmen

- **Nur zur professionellen In-vitro-Diagnostik.**
- Besonders bei der Therapieüberwachung sorgfältig darauf achten, dass die Osteomark NTx-Serumwerte und Osteomark NTx-Urinwerte nicht miteinander verwechselt werden.
- Die Kalibratoren und Kontrollen enthalten aus Humanknochengewebe oder Humanserum aufbereitetes Antigen. Zwar ist jede Charge durch von der FDA zugelassene Verfahren als nicht-reaktiv für HIV-1, HIV-2, HBsAg, HCV und RPR dokumentiert worden, doch sollte dieses Material als potenziell infektiös behandelt werden und ordnungsgemäß entsorgt werden.
- Das Chromogen-Reagenz enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO wird leicht durch die Haut aufgenommen. Bei Kontakt die betroffenen Stellen 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Bei Augenkontakt sofort ärztliche Hilfe aufsuchen. TMB steht im Verdacht, karzinogen zu wirken.
- Serumproben können infektiöse Materialien enthalten und müssen ordnungsgemäß entsorgt werden. Zur Inaktivierung wird am besten eine 0,5%ige Natriumhypochloritlösung (Bleichmittelkonzentrat 1:10 verdünnen) verwendet oder die Probe eine Stunde bei 121 °C autoklaviert. Lösungen mit Natriumhypochlorit nicht autoklavieren. Natriumhypochloritlösung nicht mit Säuren mischen.
- Reagenzien oder klinische Proben niemals mit dem Mund pipettieren.
- Das Stopp-Reagenz enthält 1N Schwefelsäure. Augen- und Hautkontakt vermeiden. Bei Kontakt die betroffenen Stellen sofort 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Bei Augenkontakt sofort ärztliche Hilfe aufsuchen.
- Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Komponenten aus verschiedenen Chargen von Osteomark NTx Serum nicht miteinander vermischen.
- Die Streifen mit Mikrovertiefungen müssen mit Trockenmittel gelagert werden. Den Beutel mit Trockenmittel nicht aus der Folienpackung entfernen. Nicht verwendete Streifen wieder sorgfältig in der Folie mit dem Beutel Trockenmittel verschließen.
- Die Mikrovertiefungen nicht wiederverwenden. Nach Verwendung ordnungsgemäß entsorgen.
- Das Assayverfahren in einer kontrollierten Laborumgebung unter Einhaltung der angegebenen Inkubationsanforderungen durchführen. Extreme Umgebungsbedingungen während des Verfahrens vermeiden.

Assayverfahren

Vorbereitende Schritte

1. Vor Durchführung des Tests müssen alle Proben und Komponenten des Testsatzes auf Raumtemperatur (20–25 °C) gebracht werden. Alle Reagenzien gründlich mischen. Schaumbildung vermeiden.
2. Die verdünnte Waschlösung für den Test ansetzen. Das 30-fache Waschkonzentrat 1:30 mit deionisiertem Wasser verdünnen (1 Teil 30-faches Waschkonzentrat plus 29 Teile deionisiertes Wasser; Beispiel: 30 ml Waschkonzentrat plus 870 ml deionisiertes Wasser), und mindestens fünf (5) Minuten lang mischen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur einen (1) Monat stabil.
3. Die Plattenkonfiguration planen, und eine Planübersicht erstellen. Es wird empfohlen, jeden Kalibrator und jede Kontrolle zweimal zu analysieren. Es folgt ein Beispiel mit 10 Proben:

	1	2	3
A	0 Kalibrator	40 Kalibrator	Probe 3
B	0 Kalibrator	40 Kalibrator	Probe 4
C	5 Kalibrator	Kontrolle Stufe I	Probe 5
D	5 Kalibrator	Kontrolle Stufe I	Probe 6
E	10 Kalibrator	Kontrolle Stufe II	Probe 7
F	10 Kalibrator	Kontrolle Stufe II	Probe 8
G	20 Kalibrator	Probe 1	Probe 9
H	20 Kalibrator	Probe 2	Probe 10

4. Die Konjugatlösung für den Test herstellen. Das Antikörperkonjugat in einem sauberen Einweg-Kunststoffbehälter mit dem Antikörperkonjugat-Diluent im Verhältnis 1:101 verdünnen. Nur durch Umkehren vorsichtig mischen. Nicht mit dem Vortex oder einem Magnetrührstab mischen. Schaumbildung vermeiden. Den Behälter nicht wiederverwenden. Die folgende Tabelle als Richtlinie zur Herstellung des Reagenzes verwenden:

Gesamtanzahl der Streifen	Konjugat-Konzentrat (µl)	Konjugat-Diluent (ml)
3–4	40	4
5–8	80	8
9–12	120	12

Die verdünnte Konjugatlösung innerhalb einer Stunde nach der Herstellung verwenden.

5. Die Kalibratoren, Kontrollen und Proben gründlich mischen.
6. Die Kalibratoren, Kontrollen und Proben mit dem Verdünnungs-Diluent in Mikroröhrchen oder äquivalenten Behältnissen in einem Verhältnis von 1:5 (1 Teil Probe und 4 Teile Proben-Diluent) verdünnen. Für jede Probe ist ein Mindestvolumen von 200 µl verdünnter Probe erforderlich. (Beispiel: 50 µl Probe + 200 µl Diluent). Die verdünnten Proben gründlich mit dem Vortex mischen, Schaumbildung dabei vermeiden.
7. Die erforderliche Anzahl Streifen mit Mikrovertiefungen aus dem verschlossenen Folienbeutel entnehmen. Unbenutzte Streifen in den Beutel zurücklegen, und den Reißverschluss des Beutels schließen. Den Beutel mit dem Trockenmittel im Folienbeutel belassen.

Proben- und Antikörperinkubation

8. Entsprechend der Plattenübersicht jeweils 100 µl jedes verdünnten Kalibrators, jeder verdünnten Kontrolle oder Probe in die Mikroplatte pipettieren. Es wird empfohlen, die Kalibratoren und Kontrollen doppelt zu analysieren. Eine kalibrierte Pipette und eine neue Pipettenspitze für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und Probe verwenden. Sofort mit Schritt 9 fortfahren.
9. Mit einer Mehrkanalpipette 100 µl der für das Assay verdünnten Konjugatlösung in jede Mikrovertiefung pipettieren. Die Platte mit einer Plattenabdeckung versiegeln und vorsichtig 15–20 Sekunden auf einer ebenen Fläche schwenken, um die Vermischung zu gewährleisten.
10. Die Platte bei Raumtemperatur (20–25 °C) 90 ± 5 Minuten lang inkubieren.
11. Während der letzten 5 Minuten der Inkubation die Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat herstellen. Dazu das Chromogen-Reagenz im Verhältnis 1:101 in dem gepufferten Substrat verdünnen. Einen sauberen Einweg-Kunststoffbehälter verwenden. Den Einweg-Behälter nicht wiederverwenden. **Nur durch Umkehren gründlich mischen. Nicht mit dem Vortex, mit Hilfe eines Magnetrührstabes oder durch kräftiges Schütteln mischen.** (Diese Mischung sollte bei der Herstellung farblos sein. Eine Lösung mit blauer Farbe ist auf eine Kontamination des Reagenzes zurückzuführen und muss verworfen werden.) Als Richtlinie sollten für jeden eingesetzten Streifen 2 ml Lösung hergestellt werden (20 µl Chromogen-Reagenz mit 2 ml des gepufferten Substrats verdünnen).
12. Am Ende der Inkubation die Plattenabdeckung vorsichtig abnehmen und entsorgen. Die Mikrovertiefungen fünfmal (5) mit der verdünnten Waschlösung mit einem automatischen Plattenwaschgerät waschen. Pro Waschzyklus ein Mindestwaschvolumen von 350 µl in jede Kavität abgeben. Nach dem Waschvorgang auf einem saugfähigen Papierhandtuch auf tupfen. (Zu wenige oder zu viele Waschzyklen können zu falschen Ergebnissen führen.) Sofort mit Schritt 13 fortfahren. Die Streifen nicht austrocknen lassen.

Farbentwicklung und -messung

13. Mit einer Mehrkanalpipette 200 µl verdünnte Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substratlösung in jede Mikrovertiefung pipettieren. Eine neue Plattenabdeckung anbringen.
14. Bei Raumtemperatur (20–25 °C) 30 ± 2 Minuten lang inkubieren. In Vertiefungen mit gebundenem Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugat entwickelt sich ein blauer Farbstoff.
15. Am Ende der Inkubation die Plattenabdeckung vorsichtig abnehmen und entsorgen.
16. Mit der Mehrkanalpipette 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren. Blau gefärbte Vertiefungen färben sich jetzt gelb. Die Platte vorsichtig 15–20 Sekunden auf einer ebenen Fläche schwenken, um ein Durchmischen zu erreichen. Vor der Bestimmung der Extinktionswerte die Platte 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) stehen lassen.
17. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stopp-Reagenzes die Extinktionswerte der Kalibratoren, Kontrollen und Proben mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesegeräts bestimmen (Messung bei 450 nm mit einem 630-nm-Referenzfilter).

Auswertung der Ergebnisse

- Die Osteomark NTx-Serumergebnisse werden in Nanomol BCE/l (nM BCE) ausgedrückt.
- Anhand der Kalibrierungskurve die Konzentrationswerte (nM BCE) der Kontrollen und Proben bestimmen. Die genauesten Ergebnisse liefert eine 4-Parameter-Logikkurven-Anpassungsgleichung. [HINWEIS: Einige Softwarepakete für 4-Parameter-Logikkurven-Anpassungsgleichungen akzeptieren keinen Kalibrierungswert von 0. Für den 0 nM BCE-Kalibrator muss in diesem Fall eine nominelle Konzentration, beispielsweise 0,001, eingegeben werden].
- Die Assayergebnisse sind bei Erfüllung der folgenden Kriterien gültig:
 - Die mittlere Extinktion des 0 nM BCE-Kalibrators muss $\geq 1,300$ sein.
 - Der Kalibrierungskurvenbereich (Differenz zwischen den Extinktionswerten des 0 nM BCE-Kalibrators und des 40 nM BCE-Kalibrators) muss $\geq 0,900$ betragen.
- Wenn Proben zweimal getestet werden, sollte der Variationskoeffizient (% VK) zwischen den zwei Konzentrationswerten (nM BCE) $\leq 20\%$ betragen. Proben mit $> 20\%$ VK sollten neu analysiert werden.
- Patientenproben mit einem Konzentrationswert unter dem 40 nM BCE-Kalibrator sollten zunächst im Verhältnis 1:2 mit dem 0 nM BCE-Kalibrator (1 Teil Probe plus 1 Teil 0 nM BCE-Kalibrator) und dann im Verhältnis 1:5 mit dem Proben-Diluent verdünnt und anschließend erneut analysiert werden. Das Endergebnis berechnen, indem die Konzentration der verdünnten Probe mit dem Faktor 2 multipliziert wird.
- Diese Serum-Kontrollbereiche wurden vom Hersteller festgelegt. Jedes Labor sollte jedoch seine eigenen Kontrollbereiche festlegen.

Grenzen des Verfahrens

Osteomark NTx Serum wird zwar als Indikator für die Knochenresorption verwendet, die Verwendung dieses Tests zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Osteoporose oder des zukünftigen Frakturrisikos wurde nicht untersucht. Zur Verwendung bei einer primären Hyperparathyreose oder Hyperthyreose oder beim Paget-Syndrom liegen keine Aussagen vor. Wird Osteomark NTx Serum zur Therapieüberwachung verwendet, können bei Patienten mit klinischen Zuständen, die die Knochenresorption beeinflussen, z. B. Knochenmetastasen, die Ergebnisse verfälscht werden. Ein Osteomark NTx-Serumwert lässt zwar Rückschlüsse auf das Ausmaß der Knochenresorption zu; ein einzelner Wert kann jedoch nicht zur Beurteilung der Knochenresorption verwendet werden, da ein Messergebnis für sich allein keine Zeitkomponente enthält. Daher sollten klinische Befunde und andere diagnostische Ergebnisse bei der Interpretation der Osteomark NTx-Serumergebnisse berücksichtigt werden.

Störsubstanzen

Es wurden verschiedene Serumbestandteile auf ihre Auswirkung auf Osteomark NTx Serum untersucht. Diese Komponenten, u. a. Gesamtbilirubin und direktes Bilirubin, Glukose, Cholesterin, Triglyzeride, Gesamtprotein, Albumin und Hämoglobin, wurden in Konzentrationen untersucht, die über den physiologischen Werten lagen, und wirkten sich nicht störend auf die Analyse aus.

Erwartungswerte

Zur Bestimmung des Referenzbereiches für gesunde, prämenopausale Frauen (mittleres Alter 36 Jahre, Bereich 25–49) wurde eine multizentrische Querschnittstudie in fünf regionalen Zentren durchgeführt. Der Referenzbereich für Männer (mittleres Alter 51 Jahre, Bereich 31–80) wurde in einer multizentrischen Querschnittstudie in drei regionalen Zentren ermittelt.⁹

	Mittelwert t*	Standardabw.	Bereich (Mittelw. ± 2 Std.abw.)	N
Frauen	12,6	3,2	6,2–19,0	257
Männer	14,8	4,7	5,4–24,2	176

Nach logarithmischer Umwandlung der Erwartungswerte bei prämenopausalen Frauen beträgt der Bereich 7,7–19,3 nM BCE. Der logarithmisch umgewandelte Referenzbereich für Männer beträgt 8,1–24,8 nM BCE. Diese Bereiche dienen nur als Richtwerte. Jedes Labor muss seinen eigenen Referenzbereich ermitteln. In einer weiteren Studie wurde die Intraprobandenvariabilität der Serum-NTx-Spiegel bei postmenopausalen Frauen bestimmt.¹⁰ Den Probandinnen wurden zur Ermittlung der Kurzzeitvariabilität an drei aufeinanderfolgenden Tagen und zur Ermittlung der Langzeitvariabilität über zwei aufeinanderfolgende Monate Blutproben entnommen. Der mittlere % VK bei den Kurzzeitproben (n = 271) betrug 7,3 %. Der mittlere % VK bei den Langzeitproben (n = 261) betrug 8,7 %. Die Intraprobandenvariabilität wurde bei den Männern in der vorgenannten Probanden-Subpopulation (siehe Referenzbereich) bestimmt. Die Kurzzeit-Intraprobandenvariabilität (4 Tage, n = 32) betrug 9,1 %, die Langzeit-Intraprobandenvariabilität (3 Monate, n = 27) betrug 9,5 %.

Leistungsdaten

Reproduzierbarkeit und Präzision des Assays

Intra-Assay-Variabilität: Die Intra-Assay-Variabilität wurde an vier Humanserumproben bestimmt, deren BCE-Werte den Kalibrierungsbereich des Assays abdeckten. Das Assay entsprach den Richtlinien der NCCLS Precision Performance Guideline EP5-T2. Für Osteomark NTx Serum ergab sich daraus eine Intra-Assay-Variabilität von 4,6 %.

Inter-Assay-Variabilität: Die Intra-Assay-Variabilität wurde an acht Humanserumproben bestimmt, deren BCE-Werte den Kalibrierungsbereich des Assays abdeckten. Für Osteomark NTx Serum ergab sich daraus eine Intra-Assay-Variabilität von 6,9 %.

Gesamt-Assay-Präzision: Die Gesamt-Assay-Präzision wurde durch die Analyse von Serumkontrollen der Stufe I (9,4 nM BCE) und Serumkontrollen der Stufe II (30,0 nM BCE) in vier klinischen Labors bestimmt.

Für die Gesamtpräzision wurde bei den Serumkontrollen der Stufe I ein VK von 13,99 % und bei Serumkontrollen der Stufe II ein VK von 11,92 % erhalten.

Antigen-Wiederfindung: Zur Bestimmung der Antigen-Wiederfindungsrate wurden neun Serumproben bekannter NTx-Konzentrationen mit bekannten Mengen NTx versetzt. Die Wiederfindung stellt den als Prozentwert des erwarteten Serumprobenwertes berechneten Assaywert der angereicherten Proben dar. Die Ergebnisse zeigten eine Antigen-Wiederfindung von 94–105 % über den gesamten Assaybereich.

Linearität der Verdünnung: Zur Bestimmung der Verdünnungslinearität wurden fünf Serumproben mit hohen nM-BCE-Werten in eine Serumprobe mit einem bekannten niedrigen nM-BCE-Wert seriell verdünnt. Die prozentuale Linearität der Verdünnung wurde durch Division des jeweiligen Messwertes durch den Erwartungswert und anschließender Multiplikation mit 100 ermittelt. Die Ergebnisse zeigten eine mittlere Wiederfindung der linear verdünnten Proben von 98 %.

Klinische Studien

Verwendung von Osteomark NTx Serum bei postmenopausalen Frauen unter HST-Behandlung

In einer klinischen Studie wurde die Eignung von Osteomark NTx Serum zur Überwachung der Wirksamkeit einer Hormonsubstitutionstherapie (HST) bezüglich der Knochenresorption sowie zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer Abnahme der Knochendichte nach einer einjährigen Calcium-Supplementierung gegenüber einer Gruppe mit HST-Therapie plus Calcium-Supplementierung überprüft.⁷ Die Ergebnisse der Studie unterstützen diese klinischen Anwendungen. Die Abbildungen 1a und 1b zeigen die Osteomark NTx-Serumwerte im Verlauf der Studie für jede Behandlungsgruppe. Vor Beginn der HST-Behandlung⁷ lag der mittlere Nulllinienwert zum Osteomark NTx Serum in dieser Gruppe bei 15,9 nM BCE, also signifikant über dem prämenopausalen Mittelwert von 12,6 nM BCE. In der HST-Gruppe fielen die NTx-Werte nach 6-monatiger Therapie signifikant auf 11,9 nM BCE ab; die mittlere Abnahme betrug 24,4 % (Abbildung 2). Die Mittelwerte in der Calciumgruppe blieben im Verlauf der 12-monatigen Studie konstant; der Nulllinienwert betrug 15,4 nM BCE, der 12-Monatswert lag bei 15,8 nM BCE. Auf Basis des NTx-Nulllinienwerts wurde das relative Risiko einer Knochendichteabnahme zwischen der HST-Gruppe und der Nur-Calcium-Gruppe miteinander verglichen. Im niedrigsten NTx-Quartil bei der Nulllinie (< 12,5 nM BCE) lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der HST-Gruppe und der Calcium-Gruppe hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit eines Knochenverlustes innerhalb eines Jahres. Ein hoher Nulllinien-NTx-Wert (> 18,1 nM BCE) zeigte ohne HST-Behandlung ein 6-fach höheres Risiko für einen Knochendichteverlust an.

Abbildung 1a. Calcium-Gruppe – Osteomark NTx-Serumwerte im Verlauf der Studie

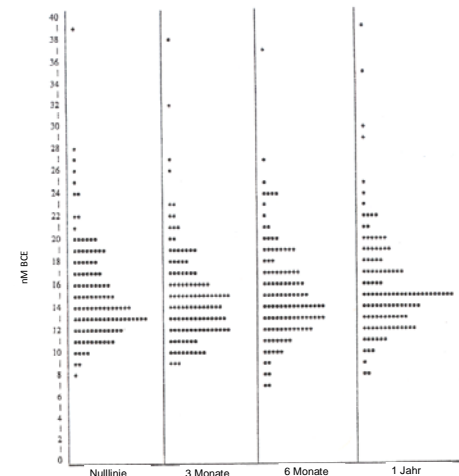


Abbildung 1b. HST-Gruppe – Osteomark NTx-Serumwerte im Verlauf der Studie

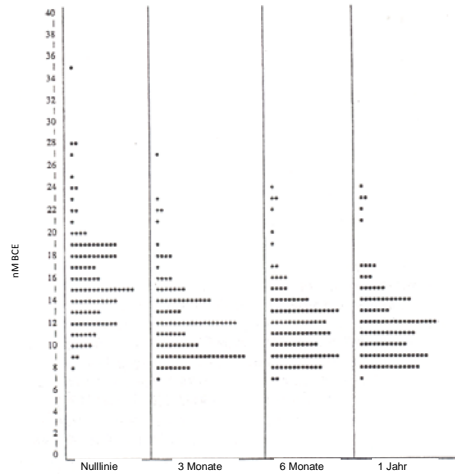
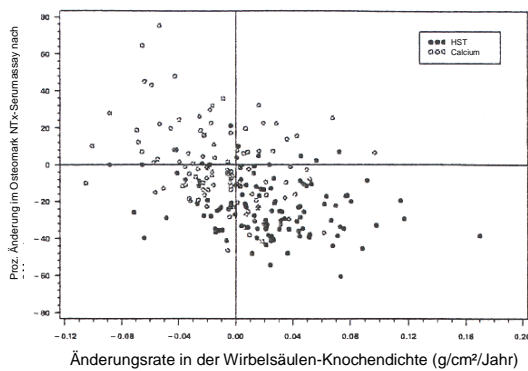


Abbildung 2. Änderungsrate der Knochendichte ggü. der prozentualen Änderung im Osteomark NTx-Serumassay



Verwendung von Osteomark NTx Serum bei postmenopausalen Frauen unter Bisphosphonat-Therapie

Eine im Nordosten der USA in einem spezialisierten Kreiskrankenhaus durchgeführte Studie sollte zeigen, ob sich anhand frühzeitig erkannter Änderungen in Osteomark NTx Serum nach einer Behandlung mit dem Bisphosphonat Natriumalendronat eine Zunahme in der Knochendichte voraussagen lässt.⁸ Die Teilnehmerinnen dieser klinischen Doppelblindstudie wurden randomisiert entweder der Placebogruppe oder der mit 5–10 mg Natriumalendronat behandelten Gruppe zugeordnet. In der Alendronat-Gruppe zeigte sich nach 6-monatiger Behandlung ein mittlerer Osteomark NTx-Serumwert von 11,0 nM BCE. Dieser Wert lag signifikant unter dem mittleren Nulllinienwert von 16,1 nM BCE (Abbildungen 3a und 3b).

Abbildung 3a. Placebogruppe – Osteomark NTx-Serumwerte im Verlauf der Studie

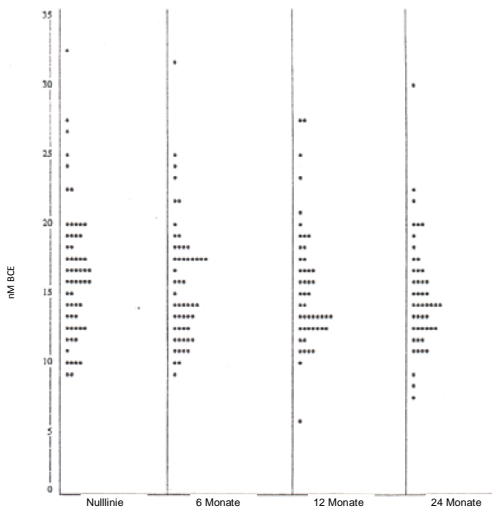
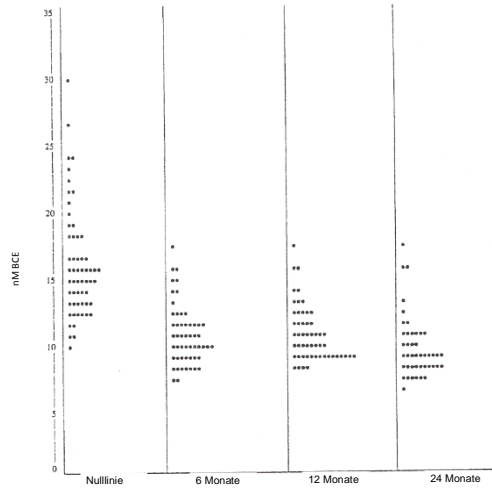
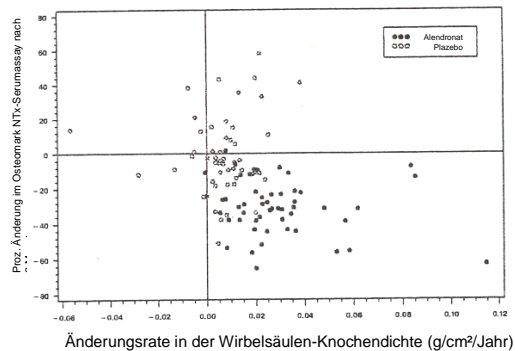


Abbildung 3b. Alendronat-Gruppe – Osteomark NTx-Serumwerte im Verlauf der Studie



Eine Stratifizierung der Osteomark NTx-Serum-Nulllinienwerte nach Terzilen zeigte, dass Probandinnen im höchsten Terzil der Nulllinienwerte (> 16,6 nM BCE) eine signifikant größere Zunahme der Wirbelsäulen-Knochendichte als die Probandinnen im niedrigsten Terzil (10,1–13,8 nM BCE) aufwiesen, $p = 0,003$. Abbildung 4 zeigt die Änderungsrate in der Wirbelsäulen-Knochendichte gegenüber der prozentualen Änderung im Osteomark NTx Serum nach 6-monatiger Therapie.

Abbildung 4. Änderungsrate der Knochendichte ggü. der prozentualen Änderung im Osteomark NTx-Serumassay



Literaturhinweise

1. Clemens J.D., et. al. Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as immunochemical marker of bone resorption. *Clin Chem.* 43:2058-2063. 1997.
2. Gertz B.J., et. al. Application of a new serum assay for type I collagen crosslinked N-telopeptides: Assessment of diurnal changes in bone turnover with and without alendronate treatment. *Calcif Tissue Int.* 63:102-106. 1998.
3. Scariano J.K., et. al. Serum levels of cross-linked N-telopeptides in aminoterminal propeptides of type I collagen indicate low bone mineral density in elderly women. *Bone.* 23:471-477. 1998.
4. Prestwood K.M., et. al. Low dose estrogen and calcium have an additive effect on bone resorption in older women. *J Clin Endo and Met.* 84:179-183. 1999.
5. Garnero P., et. al. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endo and Met.* 79:1963-1700. 1994.
6. Garnero P., et. al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 11:337-349. 1996.
7. Chesnut C.H., et. al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: Urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *Am. J. Med.* 102:29-37. 1997.
8. Greenspan S.L., et. al. Early changes in biochemical markers of bone turnover predict the long-term response to alendronate therapy in representative elderly women: A randomized clinical trial. *J Bone Miner Res.* 13:1431-1438. 1998.
9. Orwoll E.S., et. al. Collagen N-telopeptide excretion in men: The effects of age and intra-subject variability. *J Clin Endo and Met.* 83:3930-3935. 1998.
10. Weiss S., et. al. Determination of the intra-subject variability in NTx excretion in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* Vol. 12. Suppl. 1, S. S506. 1997.

Osteomark NTx Serum – Kurzanleitung

1. Vor Beginn des Assays den Abschnitt „Assayverfahren“ gründlich durchlesen.
2. Alle Proben und die Komponenten des Sets auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Alle Reagenzien gründlich mischen.
3. Die verdünnte Waschlösung für den Test ansetzen. Das 30-fache Waschkonzentrat 1:30 mit deionisiertem Wasser verdünnen.
4. Die Plattenkonfiguration planen, und eine Planübersicht erstellen.
5. Die Antikörperkonjugatlösung für das Assay im Verhältnis 1:101 verdünnen. Pro Streifen wird ca. 1 ml benötigt.
6. 1:5-Verdünnungen der Kalibratoren, Kontrollen und Proben im Proben-Diluent mit Mikroröhrchen oder ähnlichen Behältnissen herstellen.
7. Entsprechend der Plattenübersicht jeweils 100 µl jedes verdünnten Kalibrators, jeder verdünnten Kontrolle oder Probe in die Mikroplatte pipettieren.
8. 100 µl der für das Assay verdünnten Konjugatlösung in jede Mikrokavität pipettieren. Die Platte mit der Plattenabdeckung verschließen, zum Vermischen vorsichtig schwenken und bei Raumtemperatur 90 ± 5 Minuten lang inkubieren.
9. Während der letzten 5 Minuten der Inkubation die Mischung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat in einer Verdünnung von 1:101 herstellen. Pro Streifen werden ca. 2 ml benötigt.
10. Die Mikrovertiefungen fünfmal (5) mit der verdünnten Waschlösung waschen. Nach dem Waschvorgang auf einem saugfähigen Papierhandtuch auf tupfen.
11. 200 µl der Mischung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat in jede Mikrokavität geben. Die Platte mit der Plattenabdeckung verschließen und bei Raumtemperatur 30 ± 2 Minuten lang inkubieren.
12. 100 µl des Stopp-Reagenzes in jede Mikrokavität geben. Die Platte zum Vermischen vorsichtig schwenken.
13. Bei Raumtemperatur fünf (5) Minuten lang inkubieren und die Extinktion jeder Mikrokavität bei 450–630 nm bestimmen. Die Ergebnisse anhand einer 4-Parameter-Logikkurven-Anpassungsgleichung berechnen.



EN: Corrosive
ES: Corrosivo
DA: Ætsende
DE: Ätzend
EL: Διαβρωτικό

FR: Corrosif
IT: Corrosivo
PT: Corrosivo
SV: Frätande
TR: Aşındırıcı

Packungsbeilage Deutsch

Eine Printversion der Packungsbeilage erhalten Sie bei Ihrem Vertriebspartner oder bei Alere.

Bestell- und Kontaktinformationen:

U.S. Gebührenfrei (nur USA): 1 877 441 7440

International: +1 321 441 7200

Technischer Kundendienst:

Hotline

Weitere Informationen erhalten Sie von Ihrem Vertriebspartner, oder setzen Sie sich unter folgender Nummer mit dem technischen Kundendienst von Alere™ in Verbindung:

<u>USA</u>	+1 877 308 8286	TS.SCR@alere.com
<u>Afrika, Russland, GUS</u>	+972 8 9429 683	ARCISproductsupport@alere.com
<u>Asien-Pazifik-Raum</u>	+61 7 3363 7711	APproductsupport@alere.com
<u>Kanada</u>	+1 800 818 8335	CANproductsupport@alere.com
<u>Europa und Naher Osten</u>	+44 161 483 9032	EMEproductsupport@alere.com
<u>Lateinamerika</u>	+57 01800 094 9393	LAPproductsupport@alere.com

OSTEOMARK® NTx Serum



Alere Scarborough, Inc.
10 Southgate Road
Scarborough, ME 04074, USA
www.alere.com



EMERGO EUROPE, Molenstraat 15, 2513 BH
Den Haag, Niederlande

Das Alere-Logo und Osteomark sind Marken der Alere-Unternehmensgruppe.
9021/Datum der Veröffentlichung: 02.11.2011 © 2011 Alere, Inc. Alle Rechte vorbehalten.
Gedruckt in den USA