

OSTEOMARK® NTx-Urintest

ELISA-(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Testverfahren zur Messung der quervernetzten N-Telopeptide aus Kollagen Typ I (NTx) in Humanurin

REF 9006

Nur zur professionellen In-vitro-Diagnostik

Vorgesehener Verwendungszweck des Osteomark®-Urintests

Der Osteomark®-Urintest dient sich zur quantitativen Bestimmung ausgeschiedener, quervernetzter N-Telopeptide aus Typ I (NTx), einem Indikator für Knochenresorption beim Menschen. Hohe NTx-Konzentrationen im Urin zeigen eine hohe Knochenresorption an. Die Messung von NTx eignet sich zur:

- Prognose der skelettalen Reaktion (Knochenmineraldichte) auf eine antiresorptive Hormontherapie bei postmenopausalen Frauen
- Therapeutischen Überwachung:
 - antiresorptiver Therapien bei postmenopausalen Frauen
 - antiresorptiver Therapien bei Patienten mit diagnostizierter Osteoporose
 - antiresorptiver Therapien bei Patienten mit diagnostiziertem Paget-Syndrom
 - einer therapeutischen Östrogensuppression
- Ermittlung der Wahrscheinlichkeit einer Abnahme der Knochenmineraldichte bei postmenopausalen Frauen mit einer Calcium-Supplementierung im Vergleich zu Frauen mit antiresorptiver Hormontherapie nach einem Jahr

Der Messbereich des Osteomark®-Urintests liegt bei 20 bis 3000 nM Knochenkollagenäquivalenten (Bone Collagen Equivalents, 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 Skelettmass und -form. Die Bestimmung spezifischer Abbauprodukte der Knochenmatrix liefert analytische Daten zur Rate des Knochenmetabolismus.

Etwa 90 % der organischen Knochengewebematrix 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 Knochengewebes darstellt und für dessen Zugfestigkeit verantwortlich ist.

Durch die Entdeckung quervernetzter N-Telopeptide aus Kollagen Typ I (NTx) im Urin 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 knochenspezifisch. Für die Bildung des NTx-Moleküls in Knochen sind die Osteoklasten verantwortlich. Es findet sich als stabiles Endabbauprodukt im Urin.

Der Osteomark®-Urintest ermöglicht eine quantitative Bestimmung der ausgeschiedenen NTx als Indikator für die Knochenresorption beim Menschen. Hohe NTx-Konzentrationen im Urin zeigen eine hohe Knochenresorption an. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass eine hohe Knochenresorptionsrate die Hauptsache des altersbedingten Knochenverlustes darstellt und eine niedrige Knochenmasse nicht nur oft zu Osteopenie führt, sondern auch Hauptsache der Osteoporose ist.^{1, 2} Wenn mehr Knochenmasse abgebaut als neu gebildet wird, ist ein Verlust der Knochenmasse die Folge. Durch Osteoporose begünstigte Frakturen sind bei älteren Frauen der Hauptgrund für eine höhere Morbidität und Mortalität.³

In einer randomisierten, prospektiven klinischen Studie wurden postmenopausale Frauen entweder mit einer Hormonersatztherapie (HET) plus Calcium-Supplementierung (500 mg täglich) oder nur mit Calcium-Supplementierung behandelt. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Eignung des Osteomark®-Urintests zur Prognose der Reaktion und Überwachung der antiresorptiven Wirksamkeit der Therapie.⁴

Die Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der Wirksamkeit einer antiresorptiven Therapie wurde in einer Studie an Patienten mit diagnostizierter Osteoporose und mit Bisphosphonattherapie (Natriumalendronat, 10 mg) gezeigt.⁵ Gemäß den Ergebnissen sollten Patienten mit Osteoporose auf einen Osteomark®-Wert von ≤ 35 nM BCE/mM Kreatinin eingestellt werden oder nach 3 Monaten Behandlung eine Änderung von ≥ 40 % gegenüber dem Ausgangswert aufweisen.

Die Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der Wirksamkeit einer antiresorptiven Therapie bei Patienten mit Paget-Syndrom wurde in einer weiteren Studie untersucht. Die mit dem Osteomark®-Urintest ermittelten Ausgangswerte und die prozentuale Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert nach Einleitung der Therapie korrelierten mit der gesamten alkalischen Phosphatase im Serum. Das therapeutische Ansprechen, definiert als eine Normalisierung der Werte, konnte anhand des Osteomark®-Urintests im Vergleich zur Messung der alkalischen Phosphatase schneller beurteilt werden. Patienten mit Paget-Syndrom, die eine antiresorptive Therapie erhalten, sollten bei Messung nach 3 Monaten Behandlung eine Veränderung von ≥ 30 % gegenüber dem mit dem Osteomark®-Urintest ermittelten Ausgangswert aufweisen.

Grundlagen des Assays

Der Osteomark®-Urintest basiert auf dem ELISA-(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Testverfahren mit kompetitiver Hemmung und verwendet Mikrotiterstreifen, auf denen NTx als Festphase adsorbiert wurde. Das NTx in der Probe konkurriert mit dem Festphasen-NTx um Bindungsstellen an die monoklonalen, mit Meerrettichperoxidase markierten Antikörper. Die Menge der an die Festphase gebundenen Antikörper ist daher umgekehrt proportional zur Menge des NTx in der Probe. Die NTx-Konzentration in der Probe wird spektrophotometrisch gemessen und über eine Standardkalibrationskurve berechnet. Die Messwerte werden über eine Kreatininbestimmung im Urin um den Urinverdünnungsfaktor korrigiert und in Nanomol Knochenkollagenäquivalente pro Liter (nM BCE) pro Millimol Kreatinin pro Liter (mM Kreatinin) angegeben.

Komponenten des Testsatzes

Im Lieferumfang enthaltene Materialien, ausreichend für 96 Vertiefungen

	Gebrauchsanweisung (1 Broschüre)	1 Broschüre
A	Platte mit 96 antigenbeschichteten Vertiefungen, 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen	1 Platte
B	Antikörperkonjugat-Konzentrat	0,4-ml-Fläschchen
C	Antikörperkonjugat-Diluent	30-ml-Flasche
D	30-faches Waschkonzentrat	125-ml-Flasche
E	Chromogen-Reagenz	0,9-ml-Flasche
F	Gepuffertes Substrat	30-ml-Flasche
G	Stopp-Reagenz	25-ml-Flasche
1	1 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
2	30 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
3	100 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
4	300 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
5	1000 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
6	3000 nM BCE-Kalibrator	0,4-ml-Fläschchen
I	Urinkontrolle Stufe I	0,4-ml-Fläschchen
II	Urinkontrolle 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.

CONJ

Antikörperkonjugat-Konzentrat, 1 Fläschchen Gereinigte monoklonale Maus-Antikörper gegen NTx, mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Mit ProClin™ 300 (0,10 %) als Konservierungsmittel. Als 100-faches Konzentrat geliefert. (0,4 ml)

CONJ DIL

Antikörperkonjugat-Diluent, 1 Flasche Gepuffertes Reagenz mit Protein stabilisatoren zur Verdünnung des Antikörperkonjugat-Konzentrats. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel (30 ml).

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. (0,9 ml)

BUFFER

Gepuffertes Substrat, 1 Flasche Gepuffertes Wasserstoffperoxid (30 ml)

SOLN STOP

Stopp-Reagenz, 1 Flasche 1N Schwefelsäure. (25 ml)

CAL xx nM

Testkalibratoren: Jeweils 1 Fläschchen mit 1, 30, 100, 300, 1000 und 3000 nM BCE. Gereinigtes NTx-Antigen in gepuffertem Diluent. Mit ProClin™ 300 (0,05 %) als Konservierungsmittel. (je 0,4 ml)

CONTROL xx

Urinkontrollen Stufe I und Stufe II, je 1 Fläschchen. Humanurin-Basis mit bekannter NTx-Konzentration. Mit ProClin™ 300 (0,10 %) als Konservierungsmittel. (je 0,4 ml)

PLATE Sealers

Plattenabdeckung aus Kunststoff, 1 Block

Hinweis: Einige Komponenten können bovines Serum oder bovines Serumalbumin enthalten.

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 30 °C oder unter 2 °C ausgesetzt werden. Verdünnte Waschlösung kann bei Raumtemperatur bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

- Ein- und Mehrkanalpipetten zur Abgabe von 25 µl, 100 µl und 200 µl
- Einweg-Pipettenspitzen
- Einweg-Kunststoffbehälter zum Mischen der Reagenzien und als Pipettierbehälter

- Waschautomat für Mikrotiterstreifen
- Spektralphotometer zum Ablesen der Mikrotiterstreifen bzw. Mikrostreifen
Das Lesegerät muss bei 450 nm mit einem 630-nm-Referenzfilter arbeiten und Extinktionen von 0 bis 3,000 Einheiten optischer Dichte messen.
- Software zur Berechnung einer 4-Parameter-Kurvenanpassung
- Deionisiertes Wasser

Gewinnung und Lagerung von Urinproben

- In einem geeigneten Probengefäß mit dicht schließendem Deckel eine Morgenurinprobe (zweite Entleerung; Spontanurin) oder eine 24-Stunden-Urinprobe sammeln.
- KEINE KONSERVIERUNGSMITTEL ZUR URINPROBE GEBEN.
- Sichtbar durch Vollblut verunreinigte Proben oder Proben mit sichtbaren Hämolyseerscheinungen können den Test beeinträchtigen und sollten entsorgt werden. Anschließend neue Proben sammeln.
- Bis zu 72 Stunden kühl (2–8 °C) oder bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur lagern. Für eine längere Lagerung einfrieren (höchstens – 20 °C). Die Proben können bis zu dreimal aufgetaut und wieder eingefroren werden.
- **Die Ausgangsproben für eine Therapieüberwachung sollten vor Einleitung der Therapie gesammelt werden. Spätere Vergleichsproben sollten stets zur gleichen Tageszeit wie die Ausgangsproben gesammelt werden.**

Warn- und Vorsichtshinweise

- **Nur zur professionellen In-vitro-Diagnostik**
- Die Antigen-beschichtete Platte mit 96 Vertiefungen, Kalibratoren und Urinkontrollen enthalten Humanurin und/oder aus Humanknochengewebe aufbereitetes Antigen. Zwar ist jede Urin- bzw. Knochencharge 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 Stopp-Reagenz enthält 1N Schwefelsäure. Kontakt mit Augen und Haut vermeiden. Bei Kontakt die betroffenen Stellen 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Bei Augenkontakt ärztliche Hilfe einholen.
- Das Chromogen-Reagenz enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Dimethylsulfoxid. Dimethylsulfoxid wird leicht über die Haut aufgenommen. Dieses Reagenz ist schädlich, wenn es eingeatmet oder verschluckt wird oder wenn es mit der Haut in Berührung kommt. Bei Kontakt die betroffenen Stellen 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Bei Augenkontakt zusätzlich ärztliche Hilfe einholen.
- Urinproben können infektiöse Substanzen enthalten und sollten ordnungsgemäß entsorgt werden. Zur Dekontamination eignet sich am besten eine 0,5 %ige Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche 1:10 verdünnen) oder die Proben werden eine Stunde bei 121 °C autoklaviert. Lösungen mit Natriumhypochlorit nicht autoklavieren. Natriumhypochloritlösung nicht mit Säure mischen.
- Reagenzien oder klinische Proben nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Handhabung von Proben und Reagenzien Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Die Hände anschließend gründlich waschen.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Komponenten aus verschiedenen Chargen von Osteomark®-Testsets nicht zusammen verwenden.
- Die Streifen mit Mikrovertiefungen müssen mit Trockenmittel gelagert werden. Nicht verwendete Streifen wieder sorgfältig in der Folie mit dem Beutel Trockenmittel verschließen.
- Mikrotiterstreifen nicht wiederverwenden. Nach Verwendung ordnungsgemäß entsorgen.
- Das Assayverfahren in einer kontrollierten Laborumgebung unter Einhaltung der angegebenen Inkubationsanforderungen durchführen. Extreme Umgebungsbedingungen während des Verfahrens vermeiden.

Testverfahren

Vorbereitende Schritte

1. **Alle Proben und Reagenzien müssen mindestens eine Stunde vor dem Test Raumtemperatur (18–28 °C) annehmen.** Die Reagenzien hierfür aus der Verpackung nehmen. Gefrorene Urinproben können bei 37 °C in einem Wasserbad oder einem Inkubator aufgetaut und dann vor dem Einsatz in der Analyse auf Raumtemperatur gebracht werden. Das Chromogen-Reagenz enthält Dimethylsulfoxid, das bei Raumtemperatur flüssig ist, im Kühlschrank jedoch fest werden kann.
2. Die verdünnte Waschlösung für den Test ansetzen. Das 30-fache Waschkonzentrat in einem Verhältnis von 1:30 mit deionisiertem Wasser verdünnen (1 Teil 30-faches Waschkonzentrat zu 29 Teilen deionisiertes Wasser) und mindestens fünf (5) Minuten lang mischen. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur einen (1) Monat lang stabil.
3. Eine Plattenübersicht mit Angaben zum Ort der Kalibratoren, Kontrollen und Urinproben erstellen. Es wird empfohlen, die Kalibratoren, Kontrollen und Urinproben auf zwei Mikrotiterstreifen zu messen. Beispiel einer Plattenübersicht für eine Osteomark®-Analyse mit 4 Proben:

	1	2	3
A	1 nM BCE-Kalibrator	1000 nM BCE-Kalibrator	Probe 1
B	1 nM BCE-Kalibrator	1000 nM BCE-Kalibrator	Probe 1
C	30 nM BCE-Kalibrator	3000 nM BCE-Kalibrator	Probe 2
D	30 nM BCE-Kalibrator	3000 nM BCE-Kalibrator	Probe 2
E	100 nM BCE-Kalibrator	Urinkontrolle Stufe I	Probe 3
F	100 nM BCE-Kalibrator	Urinkontrolle Stufe I	Probe 3
G	300 nM BCE-Kalibrator	Urinkontrolle Stufe II	Probe 4
H	300 nM BCE-Kalibrator	Urinkontrolle Stufe II	Probe 4

4. Das Antikörperkonjugat-Konzentrat in einem sauberen Einweg-Kunststoffbehälter mit dem Antikörperkonjugat-Diluent 1:101 verdünnen. Als Richtlinie sollte für jeden eingesetzten antigenbeschichteten Mikrotiterstreifen 20 µl Antikörperkonjugat-Konzentrat mit 2 ml Antikörperkonjugat-Diluent verdünnt werden. Durch Umkehren vorsichtig mischen. **Nicht mit dem Vortex oder einem Magnetrührstab mischen.** Schaumbildung vermeiden. Die Konjugatlösung in Arbeitskonzentration innerhalb von einer Stunde nach der Zubereitung verwenden. Den Behälter nicht wiederverwenden.
5. Die Kalibratoren, Kontrollen und Urinproben vor dem Pipettieren vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden. Trübe oder unklare Proben vor dem Pipettieren 5 bis 10 Minuten stehen lassen. Partikelbelastete Proben können vor der Verwendung zentrifugiert werden.
6. Die erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus der versiegelten Folienverpackung nehmen. Nicht benutzte Streifen in die Folienverpackung zurücklegen und den Reißverschluss schließen. Das Kissen mit Trockenmittel nicht aus der Folienverpackung nehmen.

Inkubation von Proben und Antikörper

Die Analyse nach Beginn ohne Unterbrechung zu Ende führen.

7. Entsprechend der in Schritt 3 erstellten Plattenübersicht jeweils 25 µl jedes Kalibrators, jeder Kontrolle und jeder Urinprobe in die entsprechenden Mikrovertiefungen pipettieren. Für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede Urinprobe eine kalibrierte Pipette und eine neue Pipettenspitze verwenden.
8. Mit einer Mehrkanalpipette 200 µl der Konjugatlösung in Arbeitskonzentration in jede Mikrovertiefung pipettieren. Die Platte mit Abdichtfolie versiegeln und 5–10 Sekunden lang vorsichtig auf einer ebenen Fläche schwenken, um ein ausreichendes Vermischen zu gewährleisten.
9. Die Platte bei Raumtemperatur (18–28 °C) 90 ± 5 Minuten lang inkubieren.
10. Die Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat während der letzten 10 Minuten der Inkubation vorbereiten. Hierfür das Chromogen-Reagenz in einem Verhältnis von 1:101 im gepufferten Substrat verdünnen. Als Richtlinie sollten für jeden verwendeten antigenbeschichteten Mikrotiterstreifen 20 µl des Chromogen-Reagenzes mit 2 ml des gepufferten Substrats verdünnt werden. Das gepufferte Substrat in einen sauberen Einweg-Kunststoffbehälter pipettieren. Das Chromogen-Reagenz vor dem Pipettieren gründlich mischen. Das Chromogen-Reagenz in das gepufferte Substratreagenz geben und zum Vermischen vorsichtig umdrehen. **Nicht mit dem Vortex, mit einem Magnetrührstab oder durch kräftiges Schütteln mischen. Die Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat innerhalb von 30 Minuten nach der Zubereitung verwenden.** Die Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat sollte bei Vermischung farblos sein. Eine blaue Färbung deutet auf eine Kontamination des Reagenzes hin. In diesem Fall muss die Lösung entsorgt werden. **Den Behälter mit der Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat nicht wiederverwenden.**
11. Die Plattenabdichtfolie nach der Inkubation vorsichtig abnehmen und entsorgen. Die Platte fünf (5) Mal mit der Waschlösung in Arbeitskonzentration mit einem Plattenwaschautomat waschen. Der Waschautomat muss mindestens 350 µl der Waschlösung in Arbeitskonzentration pro Vertiefung abgeben. Die Vertiefungen sollten zwischen den Waschzyklen mit Waschlösung in Arbeitskonzentration gefüllt werden. Nach dem Waschvorgang den Plattenrahmen an beiden Seiten in der Mitte fassen, umdrehen und auf einem saugfähigen Papierhandtuch legen. Die vorbereitete Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat wie unten beschrieben sofort hinzugeben.

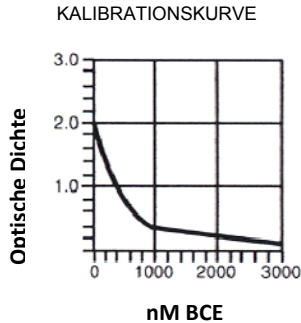
Farbentwicklung und -messung

12. Mit einer Mehrkanalpipette 200 µl der in Schritt 10 vorbereiteten Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat in jede Vertiefung pipettieren. Die Platte mit einer neuen Plattenabdeckung verschließen.
13. Bei Raumtemperatur 15 ± 1 Minuten inkubieren. In Vertiefungen mit gebundenem Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugat verfärbt sich der Inhalt blau.
14. Die Plattenabdeckung nach der Inkubation vorsichtig von der Platte abnehmen und entsorgen. Mit einer Mehrkanalpipette 100 µl des Stopp-Reagenzes in jede Vertiefung pipettieren, und zwar in derselben Reihenfolge in der das Reagenz aus Chromogen und gepuffertem Substrat zugegeben wurde. Blau gefärbte Vertiefungen färben sich jetzt gelb.
15. Die Platte zum Mischen vorsichtig 5–10 Sekunden lang vorsichtig auf einer ebenen Fläche schwenken. Vor der Bestimmung der Extinktionswerte die Platte 5 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen.
16. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Stopp-Reagenzes die Extinktionswerte der Kalibratoren, Kontrollen und Proben bestimmen. Hierfür ein Lesegerät für Mikrotiterplatten bei 450 nm mit einem Referenzfilter von 630 nm verwenden. Das Lesegerät muss einen Maximalwert der optischen Dichte von ≥3,000 aufweisen.

Auswertung der Ergebnisse

- Die Konzentrationen (nM BCE) der Kontrollen und Urinproben mit einer 4-Parameter-Kurvenanpassungsgleichung bestimmen.

BEISPIEL:



2. Die Assayergebnisse sind bei Erfüllung der folgenden Kriterien gültig:

- Die mittlere Extinktion des 1 nM BCE-Kalibrators muss $\geq 1,500$ betragen.
 - Die Spanne der Kalibratorkurve (Unterschied zwischen dem Extinktionswert des 1 nM BCE und dem des 3000 nM BCE-Kalibrators) muss $\geq 1,300$ betragen.
- Der empfohlene Variationskoeffizient (% VK) der Urinkonzentration (nM BCE) bei Duplikaten beträgt $\leq 20\%$. Proben mit $>20\%$ VK sollten neu analysiert werden.
 - Die untere Nachweisgrenze beträgt 20 nM BCE (Assaywert, enthält keine Kreatininkorrektur).
 - Urinproben mit einem Wert von über 3000 nM BCE können in einem Verhältnis von 1:5 in einer Urinprobe oder einem Urinpool mit einem bekannten Bereich von 200–500 nM BCE verdünnt und erneut analysiert werden. Wenn Urin zur Verdünnung verwendet wird, sollte der nM BCE-Wert des zur Verdünnung verwendeten Urins durch eine Analyse als Probe auf derselben Platte wie die verdünnte, unbekannte Probe bestätigt werden. Der Verdünnungsfaktor und der Hintergrund (der nM BCE des Diluents) müssen in die Endberechnung einfließen.

Beispiel: Aus einer Verdünnung von 1:5 einer 4000 nM BCE-Probe mit Urin als Verdünnung und bekanntem Osteomark®-Wert (300 nM BCE) wurde der Assaywert 1040 nM BCE abgeleitet.

$$1040 \text{ nM BCE} - (0,8 \times 300 \text{ nM BCE}) = 800 \text{ nM BCE}$$

$$800 \text{ nM BCE} \times 5 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = 4000 \text{ nM BCE}$$

Hinweis: Eine Verdünnung von 1:5 bedeutet einen Anteil von 80 % Diluent (0,8) und 20 % Probe.

- Konzentrationen der Urinproben entsprechend dem nachfolgenden Beispiel als nM BCE/mM Kreatinin angeben:

$$\begin{aligned} \text{Assaywert} &= 360 \text{ nM BCE} \\ \text{Urinkreatinin} &= \frac{60 \text{ mg/dl Kreatinin}}{11,3^*} \\ &= 5,3 \text{ mM Kreatinin} \\ \frac{360 \text{ nM BCE}}{5,3 \text{ mM Kreatinin}} &= 68 \text{ nM BCE/mM Kreatinin} \end{aligned}$$

*Hinweis: Umrechnungsfaktor für die Umrechnung von mg Kreatinin pro dl in Millimol Kreatinin pro Liter.

- Die Kontrollbereiche für Urin wurden vom Hersteller festgelegt. Jedes Labor sollte jedoch seine eigenen Kontrollbereiche festlegen.

Grenzen des Verfahrens

Die Ergebnisse des Osteomark®-Urintests werden als Indikator für die Knochenresorption verwendet. Die Eignung dieses Tests zur Prognose der Entwicklung einer Osteoporose oder eines zukünftigen Frakturrisiko wurde nicht untersucht. Auch zur Verwendung bei einer primären Hyperparathyreose oder Hyperthyreose liegen keine Daten vor. Wenn der Osteomark®-Urintest zur Überwachung der Therapie eingesetzt wird, können die Ergebnisse bei Vorliegen von klinischen Zuständen, die sich auf die Knochenresorption auswirken (z. B. Knochenmetastasen), beeinflusst werden. Die mit dem Osteomark®-Urintest ermittelten Werte lassen Rückschlüsse auf das Ausmaß der Knochenresorption zu. Ein einzelner Wert kann jedoch nicht zur Beurteilung der Knochenresorptionsrate herangezogen werden, da die berichteten Messergebnisse keine Zeitkomponente enthalten. Die Ergebnisse des Osteomark®-Urintests sollten in Kombination mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Ergebnissen ausgewertet werden.

Störsubstanzen

Eine Reihe von Bestandteilen und Mikroorganismen im Urin wurden auf ihre Auswirkung auf den Osteomark®-Urintest untersucht. Die getesteten Organismen *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) und *C. albicans* (ATCC 14053) zeigten keine Beeinträchtigung der Assayleistung. Auch humanes

Albumin, Bilirubin, Glucose und Vitamin C beeinträchtigten die Assayleistung nicht. Sichtbar mit Vollblut verunreinigte Proben oder Proben mit sichtbaren Hämolyseerscheinungen können die Assayleistung beeinträchtigen. Solche Proben entsorgen und neue Urinproben sammeln.

Erwartungswerte

Der Referenzbereich bei gesunden, prämenopausalen Frauen (mittleres Alter 36 Jahre, Bereich 25–49) und Männern (mittleres Alter 56 Jahre, Bereich 31–87) wurde im Rahmen einer multizentrischen Querschnittsstudie bestimmt.

Tabelle 1:

Bereich der mit dem Osteomark®-Urintest ermittelten Erwartungswerte für Männer und prämenopausale Frauen

	Mittelwert*	Standardabweichung	Bereich (Mittelwert \pm Standardabweichung)*	N
Frauen	35	15	5–65	258
Männer	33	15	3–63	206

* angegeben in nM BCE/mM Kreatinin

Wenn der Bereich der Erwartungswerte für prämenopausale Frauen logarithmisch umgewandelt wird, liegt er bei 14–74 nM BCE/mM Kreatinin. Der logarithmisch umgewandelte Referenzbereich für Männer liegt bei 13–78 nM BCE/mM Kreatinin.

Die erwartete, kurz- und langfristige intraindividuelle Variabilität wurde in prospektiven Studien bei gesunden, postmenopausalen Frauen (n=276, 268) und Männern über 30 Jahre (n=36, 35) ermittelt. Die Kurzzeitvariabilität wurde in nacheinander gesammelten Urinproben über 3–4 Tage bestimmt. Die Langzeitvariabilität wurde aus über 2–3 Monaten gesammelten Proben ermittelt. Die kurzfristige Variabilität betrug 15 % bei Frauen und 18 % bei Männern. Die langfristige Variabilität betrug 18 % bei Frauen und 19 % bei Männern.

Leistungsdaten

Reproduzierbarkeit und Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität wurden acht Urinproben in zehnfacher Ausführung von vier Laboranten analysiert. Ergebnisse:

Probe	Mittelwert (nM BCE)	CV (%)
A	26	19
B	111	8
C	172	8
D	417	5
E	694	5
F	1113	5
G	1768	6
H	2640	5

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität wurden drei Urinproben in jeweils zweifacher Ausfertigung von einem Laboranten in insgesamt 20 separaten Analysenläufen untersucht. Ergebnisse:

Probe	Mittelwert (nM BCE)	VK (%)
A	79	5
B	412	3
C	1167	4

Zur Bestimmung der Gesamtpräzision des Assays wurden die Urinkontrollen der Stufe I und der Stufe II in drei verschiedenen klinischen Labors über einen Zeitraum von 30 Tagen analysiert. Die Urinkontrolle der Stufe I wies einen Mittelwert von 439 nM BCE mit einem VK von 10 % auf. Die Urinkontrolle der Stufe II wies einen Mittelwert von 1537 nM BCE mit einem VK von 7 % auf.

Antigen-Wiederfindung

Zur Bestimmung der Antigen-Wiederfindung wurde drei Urinproben mit bekannter NTx-Konzentration NTx in bekannten Mengen zugegeben. Die Wiederfindung stellte den gemessenen Assaywert der angereicherten Probe dar, der als Prozentwert in Relation zum erwarteten Urinwert angegeben wird (Urin-Ausgangswert plus Wert des zugesetzten Antigens (NTx)). Die Ergebnisse zeigten eine mittlere Antigen-Wiederfindung von 105 % über den gesamten Testbereich.

Verdünnungslinearität

Zur Bestimmung der Verdünnungslinearität wurden Verdünnungsreihen an vier Urinproben mit hohen nM BCE-Werten durchgeführt. Die Urinproben wurden auf einen Wert von 200–500 nM BCE verdünnt. Die Ergebnisse wiesen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,999$ bis $r = 1,000$ über den gesamten Testbereich auf.

Klinische Studien

Verwendung des Osteomark®-Urintests bei postmenopausalen Frauen

Die Eignung des Osteomark®-Assays für die Überwachung der Wirksamkeit einer Hormonersatztherapie (HET) in Bezug auf die Knochenresorption sowie für eine Prognose des Ansprechens auf die HET wurde in einer klinischen Studie bei Frauen in der frühen Postmenopause untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie

bestätigen die klinische Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der antiresorptiven Hormontherapie bei Frauen in der frühen Postmenopause und zur Vorhersage der durch die Hormonersatztherapie verursachten und mittels Röntgenabsorption nach der DEXA-Methode gemessenen Änderungen in der Knochenmineraldichte. Dies ermöglicht beispielsweise eine Identifizierung von Patienten, für die eine solche Therapie den größten Nutzen bringen würde, oder von Patienten mit einem hohen Risiko eines Knochenverlustes (gemessen über eine Bestimmung der Knochenmineraldichte).⁴ Informationen zum Risiko eines Knochenmineraldichteverlustes ergeben sich durch Auswertung der Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe. (Tabelle 2): Im niedrigsten NTx-Quartil (≤ 38 nM BCE/mM Kreatinin) lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der HET-Gruppe und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit eines Knochenverlustes innerhalb eines Jahres vor. Ein hoher NTx-Ausgangswert (>67 nM BCE/mM Kreatinin) deutete auf ein um 17,3 erhöhtes Risiko eines Knochenmineraldichteverlustes ohne Hormonersatztherapie hin.

NTx-Ausgangswert* (nM BCE/mM Kreatinin)	Relatives Risiko	95 % KI
18–38	1,4	0,8–2,5
38–51	2,5	1,0 – 6,1
51–67	3,8	1,6–9,1
67–188	17,3	2,5–118,5

*N = 54, 53, 57 und 55 für jeweils jedes Quartil

Verwendung des Osteomark®-Urintests bei Patienten mit diagnostizierter Osteoporose

In einer Studie wurde die Sicherheit und Wirksamkeit eines neuen Aminobiphosphonats (Alendronat) zur Behandlung der Osteoporose untersucht.⁵ Die nachfolgenden Daten bestätigen die klinische Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der Knochenresorption bei Frauen mit Osteoporose und antiresorptiver Therapie mit Alendronat 10 mg.

- Drei Monate nach Beginn der Behandlung lag der Osteomark®-Wert bei 80 % (71/89) der Probanden bei ≤ 35 nM BCE/mM Kreatinin und bei 87 % (76/87) wurde eine Abnahme um ≥ 40 % im Vergleich zum Ausgangswert verzeichnet.
- 90 % (77/86) der Probanden hatten ein Jahr nach Therapiebeginn einen Osteomark®-Wert von ≤ 35 nM BCE/mM Kreatinin und bei 92 % (77/84) wurde eine Abnahme um ≥ 40 % im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet.
- Die Osteomark®-Werte bei Frauen mit Osteoporose sollten während einer antiresorptiven Therapie daher überwacht und auf einen Wert von ≤ 35 nM BCE/mM Kreatinin eingestellt werden, es sei denn, nach 3 Monaten wurde eine Abnahme von ≥ 40 % im Vergleich zum Ausgangswert verzeichnet.

Verwendung des Osteomark®-Urintests bei Patienten mit diagnostiziertem Paget-Syndrom

Die Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der Wirksamkeit einer Biphosphonattherapie hinsichtlich der Knochenresorption wurde im Rahmen einer Studie bei Patienten mit diagnostiziertem Paget-Syndrom untersucht. Die nachfolgenden Daten bestätigen die klinische Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der Wirksamkeit einer Biphosphonat-Therapie in Bezug auf die Knochenresorption bei Patienten mit diagnostiziertem Paget-Syndrom.

Zeitpunkt	Alendronat	Etidronat	Pamidronat
Monat 1*	- 48 %	- 39 %	- 71 %
Monat 3**	- 77 %	- 58 %	- 67 %
Monat 6***	- 87 %	- 72 %	- 71 %

*N = jeweils 22, 17 und 20

**N = jeweils 28, 23 und 20

***N = jeweils 27, 22 und 20

*Die Osteomark®-Werte bei Patienten mit Paget-Syndrom sollten während einer antiresorptiven Therapie überwacht und auf eine Abweichung um ≥ 30 % oder einen Rückgang in den Normalbereich eingestellt werden.

Tabelle 4. Prozentualer Anteil der auf die Therapie ansprechenden Patienten, definiert durch eine Normalisierung der Messwerte (Osteomark®) 5–65 nM BCE/mM Kreatinin, gesamte alkalische Phosphatase 39–115 IE/l; Anzahl der Patienten mit normalisierten Messwerten/Gesamtzahl der Patienten)

Zeitpunkt*	Osteomark® Patienten mit Ansprechen gemäß Osteomark®	Patienten mit Ansprechen gemäß Bestimmung der gesamten alkalischen Phosphatase
Monat 1	19 %	2 %
Monat 3	34 %	28 %
Monat 6	42 %	42 %

*N = jeweils 59, 71 und 69

- Ein Rückgang der gesamten alkalischen Phosphatase in den Normalbereich wird als Indikator für das therapeutische Ansprechen bewertet. Die mit dem Osteomark®-Urintest ermittelten Werte geben ebenfalls Aufschluss über das Ansprechen. Im Vergleich zur Bestimmung der gesamten, alkalischen Phosphatase ermöglichen sie eine schnellere Beurteilung.

Verwendung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der therapeutischen Östrogensuppression

Die Eignung des Osteomark®-Assays zur Überwachung der Wirksamkeit einer therapeutischen Östrogensuppression auf die Knochenresorption wurde im Rahmen einer Studie bei prämenopausalen Frauen untersucht.⁶ Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die klinische Eignung des Osteomark®-Urintests zur Überwachung der Wirksamkeit einer therapeutischen Östrogensuppression auf die Knochenresorption.

Literaturhinweise

1. 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.* 79:1693-1700. 1994.
2. 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.
3. Prestwood K.M., et al. The short term effects of conjugated estrogen on bone turnover in older women. *J Clin Endo and Met.* 79:366-371. 1994.
4. Chesnut C.H. III, 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.
5. Liberman U.A., et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *NEJM* 333:1437-1443. 1995.
6. Marshall L.A., et al. Urinary N-telopeptides to monitor bone resorption while on GnRH agonist therapy. *Obstet Gyn.* 87:350-354. 1996.
7. Hanson D.A., et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: Quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res.* 7:1251-1258. 1992.
8. Rosen H.N., et al. Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. *Calcif Tissue.* 54:26-29. 1994.
9. Gertz B.J., et al. Monitoring bone resorption in early postmenopausal women by an immunoassay for cross-linked collagen peptides in urine. *J Bone Miner Res.* 9:135-142. 1994.
10. Bollen A.M., et al. Bone resorption rates in children monitored by the urinary assay of collagen type I cross-linked peptides. *Bone.* 15:31-34. 1994.
11. Siris E., et al. Comparative study of alendronate versus etidronate for the treatment of Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:961-967. 1996. Demers L., et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. *Clin Chem.* 41:1489-1494. 1995.
12. Fujimoto D., et al. Analyses of pyridinoline, a cross-linking compound of collagen fibers, in human urine. *J Biochem.* 94:1133-1136. 1983.
13. Black D., et al. Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 169:197-203. 1989.
14. Uebelhart D., et al. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: A new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner.* 8:87-96. 1990.
15. Uebelhart D., et al. Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J Clin Endocrinol Metab.* 72:367-373. 1991.
16. Beardsworth L.J., et al. Changes with age in the urinary excretion of lysyl and hydroxylslypyridinoline: Two new markers of bone collagen turnover. *J Bone Miner Res* 5:671-676. 1990.
17. Gunja-Smith Z., et al. Collagen cross-linking compounds in human urine. *Biochem J.* 197:759-762. 1981.

Kurzanleitung für den Osteomark® NTx-Urintest

1. Vor Beginn der Analyse den Abschnitt „Testverfahren“ gründlich durchlesen.
2. Die Komponenten des Testsets und die Proben auf Raumtemperatur erwärmen.
3. Das Antikörperkonjugat-Konzentrat in einem Verhältnis von 1:101 mit dem Antikörperkonjugat-Diluent verdünnen. Durch Umkehren vorsichtig mischen. Die Konjugatlösung in Arbeitskonzentration innerhalb von einer Stunde nach der Zubereitung verwenden.
4. Jeweils 25 µl jedes Kalibrators, jeder Kontrolle und jeder Urinprobe in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
5. 200 µl der verdünnten Konjugatlösung in Arbeitskonzentration in jede Vertiefung pipettieren. Zum Vermischen vorsichtig schwenken. Die Platte bei Raumtemperatur 90 ± 5 Minuten inkubieren.
6. Während der letzten 10 Minuten der Inkubation die Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat vorbereiten. Hierzu das Chromogen-Reagenz in einem Verhältnis von 1:101 mit dem gepufferten Substrat verdünnen. NUR DURCH UMKEHREN vorsichtig mischen. **Nicht mit dem Vortex, mit einem Magnetrührstab oder durch kräftiges Schütteln mischen. Die Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat innerhalb von 30 Minuten nach der Zubereitung verwenden.**

7. Die Mikrotiterstreifen fünf (5) Mal mit jeweils 350 µl der verdünnten Waschlösung in Arbeitskonzentration pro Vertiefung waschen und auf einem saugfähigen Papiertuch legen.
8. 200 µl der Lösung aus Chromogen-Reagenz und gepuffertem Substrat in jede Mikrovertiefung pipettieren und bei Raumtemperatur 15 ± 1 Minuten lang inkubieren.
9. In jede Mikrovertiefung 100 µl Stopp-Reagenz pipettieren. Die Platte zum Vermischen vorsichtig schwenken.
10. Bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubieren und die Extinktion jeder Mikrovertiefung bei 450–630 nm ablesen. Die Ergebnisse anhand einer 4-Parameter-Kurvenanpassungsgleichung berechnen.



EN: Corrosive	FR: Corrosif
ES: Corrosivo	IT: Corrosivo
DA: Ætsende	PT: Corrosivo
DE: Ätzend	SV: Frätande
EL: Διαβρωτικό	TR: Aşındırıcı

Packungsbeilage Deutsch

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

Bestell- und Kontaktinformationen:

Gebührenfrei (nur USA) 1-877-441-7440
International: +1-321-441-7200

Technischer Kundendienst:

Hotline

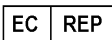
Weitere Informationen erhalten Sie von Ihrem Vertriebspartner, oder setzen Sie sich unter folgender Nummer mit dem technischen Kundendienst von Alere in Verbindung:

<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-Urintest



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.
9006/STAND: 2011-11-02 © 2011 Alere, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Gedruckt in den USA