

Test urinaire OSTEOMARK® NTx

Méthode immuno-enzymatique (EIA) pour la mesure des N-télopeptides croisés du collagène de type 1 (les NTx) dans l'urine humaine

REF 9006

Réservé exclusivement à un usage diagnostique *in vitro*

Application du test Osteomark®

Osteomark® est un test urinaire permettant la mesure quantitative de l'excrétion de N-télopeptides croisés du collagène de type 1 (les NTx) afin de déterminer le niveau de résorption osseuse chez l'homme. Des niveaux élevés de NTx dans l'urine indiquent une résorption osseuse importante. La mesure des NTx est destinée à :

- prévoir la réponse squelettique (densité minérale osseuse) au traitement hormonal antirésorption post-ménopause ;
- faciliter le suivi des traitements suivants :
 - traitements antirésorption post-ménopause ;
 - traitements antirésorption sur les sujets atteints d'ostéoporose ;
 - traitements antirésorption sur les sujets atteints de la maladie de Paget ;
 - traitements de suppression des œstrogènes.
- déterminer la probabilité d'une diminution de la densité minérale osseuse après un an chez les femmes en post-ménopause recevant un complément de calcium par rapport à celles recevant un traitement hormonal antirésorption.

Le domaine de mesure de l'Osteomark® est de 20 à 3 000 nmol ECO (Équivalent de Collagène Osseux).

Résumé et explication du test

L'os est constamment remodelé par un processus double de résorption osseuse ostéoclastique et de néoformation ostéoblastique. Ce processus est nécessaire au développement normal et à la préservation du squelette. Si des anomalies se produisent lors de ce processus d'actions indissociables, la masse et la forme du squelette peuvent en être altérées. La mesure des produits de dégradation spécifiques de la matrice osseuse offre des données analytiques sur le rythme du métabolisme osseux.

La matrice organique du tissu osseux est constituée à 90 % environ de collagène de type 1. Le collagène de type 1, une protéine hélicoïdale réticulée aux extrémités N et C de la molécule, forme le tissu de base et la résistance élastique du tissu osseux.

La découverte, dans l'urine, de N-télopeptides croisés du collagène de type 1 (les NTx) a permis de fournir un marqueur biochimique spécifique de la résorption osseuse humaine qui peut être analysé par dosage immunologique. Ces molécules sont spécifiques au tissu osseux : elles sont dotées d'une séquence d'acides-amino unique et d'une orientation particulière des N-télopeptides croisés alpha-2 (I). La génération de la molécule NTx est réalisée par les ostéoclastes de l'os. Elle est détectée dans l'urine sous la forme d'un produit de dégradation final stable.

Osteomark® offre une mesure quantitative de l'excrétion de NTx qui permet de déterminer le niveau de résorption osseuse chez l'homme. Des niveaux élevés de NTx dans l'urine indiquent une résorption osseuse importante. Des recherches cliniques ont démontré qu'une résorption osseuse importante est la principale cause de perte osseuse liée à l'âge et qu'une faible masse osseuse conduit fréquemment à l'ostéopénie et généralement à l'ostéoporose.^{1,2} La perte de masse osseuse survient lorsque les niveaux de résorption osseuse sont supérieurs aux niveaux de formation osseuse. Les fractures ostéoporotiques sont à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité accrues chez les femmes âgées.³

Un essai clinique prospectif randomisé réalisé sur des femmes en post-ménopause traitées par hormonothérapie substitutive associée à des compléments de calcium (500 mg par jour) ou recevant uniquement des compléments de calcium confirme que le test Osteomark® permet de prévoir la réponse osseuse et d'assurer le suivi de l'effet antirésorptif du traitement.⁴

Une étude réalisée sur des patients atteints d'ostéoporose traités par bisphosphonate (10 mg d'alendronate monosodique) atteste de cette capacité de suivi.⁵ Les résultats démontrent que le patient ostéoporotique doit présenter, après trois mois de traitement, une valeur Osteomark® inférieure ou égale à 35 nmol ECO/mmol de créatinine ou une altération supérieure ou égale à 40 % de la valeur initiale.

Une étude a été menée en vue de déterminer la capacité du test Osteomark® à assurer le suivi de l'effet du traitement antirésorption sur les patients atteints de la maladie de Paget. Les valeurs Osteomark® initiales et le pourcentage

d'altération de ces valeurs initiales une fois le traitement commencé ont été mises en corrélation avec celles obtenues à l'aide de la phosphatase alcaline sérique totale. Osteomark® a permis une évaluation plus précoce de la réponse thérapeutique que la phosphatase alcaline, définie par la normalisation de valeurs. Chez les patients atteints de la maladie de Paget recevant un traitement antirésorption doit être constatée une évolution supérieure ou égale à 30 % des valeurs initiales Osteomark® après trois mois de traitement.

Principes du test

Le test Osteomark® est une méthode immuno-enzymatique (ELISA) à inhibition compétitive qui utilise des micropuits qui font office de phase solide sur laquelle les NTx sont adsorbés. Les NTx de l'échantillon se lient aux NTx de la phase solide au niveau des sites de liaison d'un anticorps monoclonal marqué à l'aide de peroxydase de raifort. La quantité d'anticorps liés à la phase solide est par conséquent inversement proportionnelle à la quantité de NTx dans l'échantillon. La quantification de la concentration de NTx dans l'échantillon est déterminée de manière spectrophotométrique et calculée à partir d'une courbe d'étalonnage standard. Lors de la dilution d'urine, les valeurs du test sont corrigées par le biais de l'analyse de créatinine urinaire et exprimées en nanomoles d'équivalents de collagène osseux par litre (nmol ECO) par millimole de créatinine par litre (mmole de créatinine).

Composants de la trousse

Matériel fourni suffisant pour 96 puits

| | Mode d'emploi (1 livret) | 1 livret |
|----|--|------------------|
| A | Plaque de 96 puits revêtue d'antigènes, 12 bandelettes pour puits de 1 x 8 | 1 plaque |
| B | Concentré de conjugué d'anticorps | Flacon de 0,4 ml |
| C | Diluant de conjugué d'anticorps | Flacon de 30 ml |
| D | Concentré de lavage 30X | Flacon de 125 ml |
| E | Réactif chromogène | Flacon de 0,9 ml |
| F | Substrat en solution tampon | Flacon de 30 ml |
| G | Réactif d'immobilisation | Flacon de 25 ml |
| 1 | Étalon 1 nmol ECO | Flacon de 0,4 ml |
| 2 | Étalon 30 nmol ECO | Flacon de 0,4 ml |
| 3 | Étalon 100 nmol ECO | Flacon de 0,4 ml |
| 4 | Étalon 300 nmol ECO | Flacon de 0,4 ml |
| 5 | Étalon 1 000 nmol ECO | Flacon de 0,4 ml |
| 6 | Étalon 3 000 nmol ECO | Flacon de 0,4 ml |
| I | Contrôle d'urine de niveau I | Flacon de 0,4 ml |
| II | Contrôle d'urine de niveau II | Flacon de 0,4 ml |
| | Produits isolants pour plaque | 1 tampon |

Description des composants

PLATE

Plaque de 96 puits revêtue d'antigènes, 12 bandelettes pour puits de 1 x 8 Antigène de NTx synthétique adsorbé sur les bandelettes des micropuits.

CONJ

Concentré de conjugué d'anticorps, 1 flacon. Anticorps monoclonal de souris purifié dirigé contre les NTx et conjugué à la peroxydase de raifort. ProClin™ 300 (0,10 %) inclus comme conservateur. Fourni sous la forme d'un concentré 100X. (0,4 ml)

CONJ DIL

Diluant de conjugué d'anticorps, 1 flacon. Réactif en solution tampon avec stabilisateurs de protéines, dans lequel le concentré de conjugué d'anticorps est dilué. ProClin™ 300 (0,05 %) inclus comme conservateur. (30 ml)

WASHBUF 30x

Concentré de lavage 30X, 1 flacon. Détergent ionique. Fourni sous la forme d'un concentré 30X. (125 ml)

CHROMOGEN

Réactif chromogène, 1 flacon. 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine dans du diméthylsulfoxyde. Fourni sous la forme d'un réactif concentré 100X. (0,9 ml)

BUFFER

Substrat en solution tampon, 1 flacon. Peroxyde d'hydrogène en solution tampon (30 ml)

SOLN STOP

Réactif d'immobilisation, 1 flacon. Acide sulfurique 1N. (25 ml)

CAL xx nM

Étalons de dosage : 1, 30, 100, 300, 1 000, 3 000 nmol ECO, 1 flacon de chaque. Antigène de NTx purifié dans un diluant en solution tampon. ProClin™ 300 (0,05 %) inclus comme conservateur. (0,4 ml chacun)

CONTROL xx

Contrôles d'urine de niveau I et II, 1 flacon de chaque. Base d'urine humaine avec concentration de NTx connue. ProClin™ 300 (0,10 %) inclus comme conservateur. (0,4 ml chacun)

Remarque : certains composants peuvent contenir du sérum bovin ou de l'albumine de sérum bovin.

Conservation des réactifs

Les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C lorsqu'ils ne sont pas utilisés. Les stabiliser à température ambiante avant utilisation. Ne pas exposer les réactifs à des températures supérieures à 30 °C ou inférieures à 2 °C. La solution de lavage diluée peut être conservée à température ambiante pendant un mois maximum.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes monocanal et multicanaux capables de fournir des volumes de 25 µl, 100 µl et 200 µl.
- Embouts de pipette jetables.
- Récipients en plastique jetables pour le mélange des réactifs et réservoirs pour pipetage.
- Laveur de micropuits automatique.
- Lecteur spectrophotométrique pour micropuits ou microbandelettes. Le lecteur doit lire à 450 nm avec un filtre de référence de 630 nm et détecter des valeurs d'absorbance de 0 à 3,000 unités de densité optique.
- Logiciel capable de calculer un ajustement de courbe à 4 paramètres.
- Eau déionisée.

Collecte et conservation des échantillons d'urine

- Collecter un second échantillon d'urine matinale (spot) ou d'urine de 24 heures dans un dispositif de collecte approprié doté d'un couvercle hermétique.
- N'AJOUTER AUCUN CONSERVATEUR À L'ÉCHANTILLON D'URINE.
- Les échantillons présentant une contamination au sang total ou une hémolyse manifestes peuvent influencer sur le test et doivent par conséquent être mis au rebut. La collecte d'un nouvel échantillon est recommandée.
- Mettre au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) pendant 72 heures maximum ou conserver à température ambiante pendant 24 heures maximum. Stocker au congélateur (-20 °C minimum) pour une conservation prolongée. Les échantillons peuvent supporter trois cycles de congélation/décongélation.
- **En cas de suivi de traitement, les échantillons initiaux doivent être collectés avant le début du traitement. Les échantillons suivants utilisés à des fins de comparaison doivent être collectés au même moment de la journée que l'a été l'échantillon initial.**

Avertissements et précautions d'emploi

- **Réservé exclusivement à un usage diagnostique in vitro**
- La plaque de 96 puits revêtue d'antigènes, les étalons et les contrôles d'urine contiennent de l'urine humaine et/ou un antigène issu de tissu osseux humain. Bien que chaque lot d'urine et d'os ait été indiqué comme étant non réactif aux anticorps HIV 1, HIV 2, HBsAg, HCV et RPR par les méthodes approuvées par la FDA, il doit être manipulé comme s'il était potentiellement infectieux et mis au rebut de manière appropriée.
- Le réactif d'immobilisation contient de l'acide sulfurique 1N. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux. En cas d'exposition, rincer à l'eau pendant 15 minutes. Si les yeux sont exposés, demander l'avis d'un médecin.
- Le réactif chromogène contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine et du diméthylsulfoxyde. Le diméthylsulfoxyde est facilement absorbé par la peau. Ce réactif est nocif en cas d'inhalation, de contact avec la peau ou d'absorption. En cas d'exposition, rincer à l'eau pendant 15 minutes. Si les yeux sont exposés, demander également l'avis d'un médecin.
- Les échantillons d'urine peuvent contenir des agents infectieux et doivent par conséquent être mis au rebut de manière appropriée. La décontamination est plus efficace si une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium (dilution au 1:10 de javel) est utilisée ou par stérilisation en autoclave à 121 °C pendant une heure. Ne pas stériliser en autoclave des solutions contenant de l'hypochlorite de sodium. Ne pas utiliser la solution d'hypochlorite de sodium conjointement avec de l'acide.
- Ne jamais porter la pipette de réactifs ou d'échantillons cliniques à la bouche.
- Porter des gants et des vêtements de protection lors de la manipulation d'échantillons et de réactifs. Bien se laver les mains après utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date d'expiration.
- Ne pas mélanger des composants de différents lots de trousse Osteomark®.
- Les bandelettes de micropuits doivent être conservées au sec. Replacer les bandelettes de micropuits inutilisées dans la pochette contenant le dessiccant.
- Ne pas réutiliser les micropuits. Les mettre au rebut de manière appropriée après utilisation.
- Réaliser la procédure de test dans un environnement de laboratoire contrôlé conforme aux exigences indiquées en matière d'incubation. Éviter les conditions ambiantes extrêmes lors de la procédure.

Procédure de test

Étapes préparatoires

1. **Laisser tous les échantillons et les réactifs se stabiliser à température ambiante (entre 18 et 28 °C) pendant une heure minimum avant de réaliser le test.** Pour en faciliter le réchauffement, retirer les réactifs de l'emballage. Les échantillons d'urine congelés peuvent être décongelés à 37 °C dans un bain d'eau ou un incubateur, puis stabilisés à température ambiante avant d'être utilisés pour le test. Le réactif chromogène contient du diméthylsulfoxyde, qui peut se solidifier lorsqu'il est réfrigéré, mais qui reste liquide à température ambiante.
2. Préparer la solution de lavage prête à l'emploi. Diluer le concentré de lavage 30X au 1:30 avec de l'eau déionisée (1 partie de concentré de lavage 30X pour 29 parties d'eau déionisée) et mélanger pendant cinq (5) minutes minimum. Cette solution reste stable pendant un (1) mois à température ambiante.
3. Créer une carte de plaque représentant l'emplacement des étalons, des contrôles et des échantillons d'urine. Il est recommandé d'analyser en double, dans des micropuits, les étalons, les contrôles et les échantillons d'urine. Un exemple de carte de plaque est donné ci-dessous pour un test Osteomark® avec 4 échantillons :

| | 1 | 2 | 3 |
|---|---------------------|-------------------------------|------------------|
| A | Étalon 1 nmol ECO | Étalon 1 000 nmol ECO | Échantillon n° 1 |
| B | Étalon 1 nmol ECO | Étalon 1 000 nmol ECO | Échantillon n° 1 |
| C | Étalon 30 nmol ECO | Étalon 3 000 nmol ECO | Échantillon n° 2 |
| D | Étalon 30 nmol ECO | Étalon 3 000 nmol ECO | Échantillon n° 2 |
| E | Étalon 100 nmol ECO | Contrôle d'urine de niveau I | Échantillon n° 3 |
| F | Étalon 100 nmol ECO | Contrôle d'urine de niveau I | Échantillon n° 3 |
| G | Étalon 300 nmol ECO | Contrôle d'urine de niveau II | Échantillon n° 4 |
| H | Étalon 300 nmol ECO | Contrôle d'urine de niveau II | Échantillon n° 4 |

4. Utiliser un récipient en plastique propre jetable pour diluer le concentré de conjugué d'anticorps au 1:101 à l'aide du diluant de conjugué d'anticorps. À titre indicatif, pour chaque bandelette de micropuits revêtue d'antigènes utilisée, diluer 20 µl de concentré de conjugué d'anticorps dans 2 ml de diluant de conjugué d'anticorps. Mélanger doucement par retournement uniquement. **Ne pas mélanger au vortex ni utiliser une barre d'agitation magnétique.** Éviter de créer de la mousse. Utiliser la solution de conjugué prête à l'emploi dans l'heure qui suit sa préparation. Ne pas réutiliser le récipient.
5. Avant le pipetage, mélanger doucement les étalons, les contrôles et les échantillons d'urine. Éviter de créer de la mousse. Laisser reposer les échantillons troubles 5 à 10 minutes avant le pipetage. Les échantillons d'urine contenant des matières particulaires peuvent être centrifugés avant utilisation.
6. Retirer le nombre approprié de bandelettes de micropuits de la pochette en aluminium scellée. Replacer les bandelettes inutilisées dans la pochette et refermer cette dernière à l'aide de la fermeture à glissière. Ne pas retirer le tampon dessiccant de la pochette en aluminium.

Incubation de l'échantillon et des anticorps

Une fois le test lancé, ne pas l'interrompre jusqu'à sa fin.

7. Selon la carte de plaque générée à l'étape 3, déposer, à l'aide d'une pipette, 25 µl de chaque étalon, contrôle ou échantillon d'urine dans le fond des micropuits indiqués. Utiliser une pipette étalonnée et de nouveaux embouts de pipette pour chaque étalon, contrôle ou échantillon d'urine.
8. À l'aide d'une pipette multicanaux, déposer 200 µl de solution de conjugué prête à l'emploi dans chaque micropuits. Appliquer un produit isolant pour plaque et remuer doucement la plaque sur une surface plane pendant 5 à 10 secondes pour un mélange optimal.
9. Incuber la plaque à température ambiante (entre 18 et 28 °C) pendant 90 minutes ± 5 minutes.
10. Préparer la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon pendant les 10 dernières minutes de l'incubation : dilution au 1:101 du réactif chromogène dans le substrat en solution tampon. À titre indicatif, pour chaque bandelette de micropuits revêtue d'antigènes utilisée, diluer 20 µl de réactif chromogène dans 2 ml de substrat en solution tampon. À l'aide d'une pipette, déposer le substrat en solution tampon dans un récipient en plastique propre jetable. Bien mélanger le réactif chromogène avant pipetage. Ajouter le réactif chromogène au réactif de substitution en solution tampon et retourner le tout pour le mélanger doucement. **Ne pas mélanger au vortex, ni remuer vigoureusement ni utiliser une barre d'agitation magnétique pour le mélange. Utiliser la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon dans les 30 minutes suivant la préparation.** La solution réactif chromogène/substrat en solution tampon doit être incolore lors du mélange. Une couleur bleue indique que le réactif a été contaminé et doit par conséquent être mis au rebut. **Ne pas réutiliser le récipient de la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon.**
11. À la fin de la période d'incubation, retirer le produit isolant pour plaque avec précaution et le mettre au rebut. Laver la plaque cinq (5) fois à l'aide de la solution de lavage prête à l'emploi dans un laveur de plaques automatique. Le laveur automatique doit fournir au moins 350 µl de solution de lavage prête à l'emploi par puits. Entre les cycles de lavage, les puits doivent être remplis de solution de lavage prête à l'emploi. Une fois le lavage terminé, saisir la plaque par le milieu des côtés et la retourner pour la laisser sécher sur un papier absorbant. Ajouter immédiatement la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon de la manière indiquée ci-dessous.

$$\frac{360 \text{ nmol ECO}}{5,3 \text{ mmol de créatinine}} = 68 \text{ nmol ECO/mmol de créatinine}$$

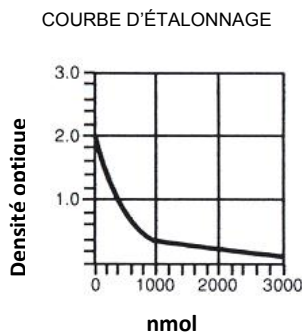
Développement des couleurs et mesure

- À l'aide d'une pipette multicanaux, déposer 200 µl de solution réactif chromogène/substrat en solution tampon préparée à l'étape 10 dans chaque puits. Recouvrir la plaque d'un nouveau produit isolant pour plaque.
- Incuber à température ambiante pendant 15 mn ±1 minute. Une couleur bleue se développe dans les puits contenant le conjugué anticorps-peroxydase de raifort.
- Après incubation, retirer avec précaution le produit isolant pour plaque et le mettre au rebut. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajouter 100 µl de réactif d'immobilisation dans chaque puits dans le même ordre que celui suivi pour l'ajout de la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon. Les puits qui ont développé une couleur bleue deviennent jaunes.
- Remuer doucement la plaque sur une surface plane pendant 5 à 10 secondes pour un mélange optimal. Laisser reposer la plaque à température ambiante pendant 5 minutes avant de relever les valeurs d'absorbance.
- Dans les 30 minutes suivant l'ajout du réactif d'immobilisation, relever les valeurs d'absorbance des étalons, des contrôles et des échantillons d'urine. Utiliser un lecteur de plaque à micropuits à 450 nm avec un filtre de référence de 630 nm. Le lecteur doit être doté d'une lecture de densité optique maximum supérieure ou égale à 3,000.

Analyse des résultats

- Déterminer les valeurs de concentration (nmol ECO) des contrôles et des échantillons d'urine à l'aide d'une équation d'ajustement de courbe à 4 paramètres.

EXEMPLE :



- Les résultats du test sont valides si les critères suivants sont remplis :
 - La valeur d'absorbance moyenne de l'étalon d'1 nmol ECO doit être $\geq 1,500$.
 - L'étendue de la courbe d'étalon (la différence entre les valeurs d'absorbance des étalons d'1 nmol ECO et de 3 000 nmol ECO) doit être $\geq 1,300$.
- Le coefficient de variation (% CV) recommandé entre les valeurs de concentration des échantillons d'urine (nmol ECO) en double est ≤ 20 %. Les échantillons dont le CV est > 20 % doivent être réanalysés.
- La limite inférieure de détection est de 20 nmol ECO (valeur de test, correction de créatinine exclue).
- Les échantillons d'urine supérieurs à 3 000 nmol ECO peuvent être dilués au 1:5 dans un échantillon d'urine ou dans un pool d'urine situé dans la plage des 200 à 500 nmol ECO, et réanalysés. En cas d'utilisation d'urine comme diluant, la valeur nmol ECO d'un échantillon de ce diluant doit être confirmée par analyse dans la même plaque que l'échantillon dilué inconnu. Le facteur de dilution et le contexte (valeur nmol ECO du diluant) doivent être intégrés au calcul final.

Exemple : une valeur de test de 1 040 nmol ECO obtenue après dilution au 1:5 d'un échantillon de 4 000 nmol ECO à l'aide d'urine de valeur Osteomark® connue (300 nmol ECO)

$$1\,040 \text{ nmol ECO} - (0,8 \times 300 \text{ nmol ECO}) = 800 \text{ nmol ECO}$$

$$800 \text{ nmol ECO} \times 5 \text{ (facteur de dilution)} = 4\,000 \text{ nmol ECO}$$

Remarque : une dilution au 1:5 équivaut à une contribution à hauteur de 80 % de diluant (0,8) et de 20 % d'échantillon.

- Indiquer les valeurs de concentration des échantillons d'urine en nmol ECO/mmol de créatinine de la manière décrite dans l'exemple suivant :

| | | |
|---------------------|---|---|
| Valeur de test | = | 360 nmol ECO |
| Créatinine urinaire | = | $\frac{60 \text{ mg/dl de créatinine}}{11,3^*}$ |
| | = | 5,3 mmol de créatinine |

*Remarque : facteur de conversion utilisé pour la conversion des milligrammes de créatinine par décilitre en millimoles de créatinine par litre.

- Ces concentrations de contrôle d'urine ont été établies par le fabricant. Il est recommandé que chaque laboratoire définisse ses propres concentrations de contrôle.

Limites de la méthode

Osteomark® est utilisé comme indicateur de résorption osseuse. Il n'est en aucun cas conçu pour la prévision du développement de l'ostéoporose ou du risque de fracture à court ou long terme. Ce test n'est pas destiné à une utilisation dans le cadre d'un hyperparathyroïdisme primaire ou d'un hyperthyroïdisme. Lors de l'utilisation d'Osteomark® pour le suivi d'un traitement, les résultats peuvent être erronés si les patients traités présentent un état clinique dont l'impact sur la résorption osseuse est connu (par exemple, métastases osseuses). Une valeur Osteomark® fournit une mesure du niveau de résorption osseuse. Néanmoins, une valeur Osteomark® unique n'est pas indicatrice du rythme de résorption osseuse, les résultats donnés ne contenant aucune mesure de temps. Les résultats Osteomark® doivent être interprétés en association avec les résultats cliniques et autres résultats diagnostiques.

Substances interférentes

Divers composants et microorganismes de l'urine ont été évalués afin de déterminer leur interférence éventuelle lors du test Osteomark®. Les organismes testés (E. coli (ATCC 25922), P. aeruginosa (ATCC 27853) et C. albicans (ATCC 14053)) n'ont pas influé sur les performances du test. L'albumine humaine, la bilirubine, le glucose et la vitamine C n'ont eu aucun impact sur les performances du test. Les échantillons d'urine présentant une contamination au sang total ou une hémolyse manifestes sont en revanche susceptibles d'influer sur les performances du test. Ces échantillons doivent être mis au rebut et un nouvel échantillon d'urine doit être collecté.

Valeurs attendues

Une étude transversale multicentrique a été menée en vue de déterminer la plage de référence pour les femmes en pré-ménopause normale (36 ans d'âge moyen, plage de 25 à 49 ans) et pour les hommes (56 ans d'âge moyen, plage de 31 à 87 ans).

Tableau 1 :

Plage de valeurs Osteomark® attendues chez les hommes et les femmes en pré-ménopause

| | Moyen ne* | Écart type | Plage (moyenne ± écart type)* | N |
|--------|-----------|------------|-------------------------------|-----|
| Femmes | 35 | 15 | 5-65 | 258 |
| Hommes | 33 | 15 | 3-63 | 206 |

*exprimée en nmol ECO/mmol de créatinine

Lorsque la plage de valeurs attendues chez les femmes en pré-ménopause est transformée de façon logarithmique, elle s'étend de 14 à 74 nmol ECO/mmol de créatinine. La plage de référence pour les hommes transformée de manière logarithmique s'étend de 13 à 78 nmol ECO/mmol de créatinine.

La variabilité intrasujet attendue à court et long terme a été déterminée à partir d'études prospectives menées auprès de femmes en bonne santé en post-ménopause (n=276, 268) et d'hommes âgés de plus de 30 ans (n=36, 35). La variabilité à court terme a été définie à partir d'échantillons d'urine uniques collectés sur 3-4 jours et la variabilité à long terme a été déterminée à partir d'échantillons collectés tous les 2-3 mois. La variabilité à court terme était de 15 % pour les femmes et 18 % pour les hommes. La variabilité à long terme était de 18 % pour les femmes et 19 % pour les hommes.

Caractéristiques des performances

Reproductibilité et précision

La variabilité intra-série a été évaluée à l'aide de huit échantillons d'urine testés en dix répliques par chacun des quatre opérateurs. Les résultats sont indiqués ci-dessous :

| Échantillon | Moyenne (nmol ECO) | CV (%) |
|-------------|--------------------|--------|
| A | 26 | 19 |
| B | 111 | 8 |
| C | 172 | 8 |
| D | 417 | 5 |
| E | 694 | 5 |
| F | 1 113 | 5 |
| G | 1 768 | 6 |
| H | 2 640 | 5 |

La variabilité inter-séries a été évaluée à l'aide de trois échantillons d'urine testés en double par un opérateur au cours de 20 analyses distinctes. Les résultats sont indiqués ci-dessous :

| Échantillon | Moyenne (nmol ECO) | CV (%) |
|-------------|--------------------|--------|
| A | 79 | 5 |
| B | 412 | 3 |
| C | 1 167 | 4 |

La précision totale du test a été évaluée grâce à l'analyse du contrôle d'urine de niveau I et du contrôle d'urine de niveau II dans trois laboratoires cliniques différents sur une période de 30 jours. Le contrôle d'urine de niveau I présentait une valeur moyenne de 439 nmol ECO et un coefficient de variation de 10 %. Le contrôle d'urine de niveau II présentait une valeur moyenne de 1 537 nmol ECO et un coefficient de variation de 7 %.

Récupération d'antigènes

La récupération d'antigènes a été évaluée grâce à l'ajout de quantités connues de NTx à chacun des trois échantillons d'urine de concentration NTx connue. La récupération représentait la valeur de test observée des échantillons enrichis, calculée sous la forme d'un pourcentage de la valeur d'urine attendue (valeur d'urine initiale plus valeur d'antigènes (NTx) ajoutés). Les résultats ont démontré une récupération d'antigènes moyenne de 105 % sur la plage du test.

Linéarité de la dilution

La linéarité de la dilution a été évaluée par la réalisation de dilutions en série de quatre échantillons d'urine présentant des valeurs nmol ECO élevées dans un échantillon d'urine présentant une valeur comprise entre 200 et 500 nmol ECO. Les résultats ont démontré des coefficients de corrélation de $r = 0,999$ à $r = 1,000$ sur la plage de test.

Études cliniques

Utilisation d'Osteomark® sur les femmes en post-ménopause

Un essai clinique a été réalisé afin de déterminer la capacité du test Osteomark® à assurer le suivi de l'effet de l'hormonothérapie substitutive sur la résorption osseuse chez les femmes en post-ménopause précoce et à prévoir la réponse osseuse à ce traitement. Les résultats confirment l'utilité clinique du test Osteomark® pour le suivi du traitement hormonal antirésorption sur les femmes en post-ménopause précoce et pour la prévision de l'altération de la densité minérale osseuse évaluée par absorptiométrie à rayons X en double énergie (DEXA) en réponse à l'hormonothérapie substitutive. Ils permettent ainsi d'identifier les personnes sur lesquelles ce traitement aurait le meilleur effet et celles qui seraient confrontées à une perte osseuse au vu de leur densité minérale osseuse. L'examen du contraste entre les groupes de suivi et les groupes de personnes traitées offre des informations concernant le risque de perte de densité minérale osseuse (tableau 2) : dans le quartile NTx le plus faible (≤ 38 nmol ECO/mmol de créatinine), aucune différence statistiquement significative n'a été observée au niveau de la probabilité de perte osseuse sur un an entre le groupe traité par hormonothérapie substitutive et le groupe de suivi. Une valeur de NTx initiale élevée (> 67 nmol ECO/mmol de créatinine) indiquait un risque 17,3 fois supérieur de diminution de la densité minérale osseuse si les sujets n'étaient pas traités par hormonothérapie substitutive.

| Valeur NTx initiale* (nmol ECO/mmol de créatinine) | Risque relatif | IC à 95 % |
|--|----------------|-------------|
| 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 et 55 pour chaque quartile, respectivement

Utilisation d'Osteomark® sur les patients atteints d'ostéoporose

Une étude a été menée afin de déterminer l'innocuité et l'efficacité d'un nouveau bisphosphonate aminé (alendronate) dans le traitement de l'ostéoporose.⁵ Les données suivantes confirment l'utilité clinique d'Osteomark® pour la surveillance des niveaux de résorption osseuse chez les femmes ostéoporotiques recevant un traitement antirésorption (10 mg d'alendronate).

- Trois mois après le début du traitement, 80 % (71/89) des sujets présentaient une valeur Osteomark® ≤ 35 nmol ECO/mmol de créatinine et 87 % (76/87) une diminution ≥ 40 % de la valeur initiale.
- Après un an de traitement, 90 % (77/86) des sujets présentaient une valeur Osteomark® ≤ 35 nmol ECO/mmol de créatinine et 92 % (77/84) une diminution ≥ 40 % de la valeur initiale.
- Par conséquent, le suivi des valeurs Osteomark® doit être assuré chez les femmes ostéoporotiques recevant un traitement antirésorption afin de veiller à ce que ces valeurs correspondent à une valeur ≤ 35 nmol ECO/mmol de créatinine ou à une diminution ≥ 40 % de la valeur initiale après trois mois.

Utilisation d'Osteomark® sur les patients atteints de la maladie de Paget

Une étude a été menée en vue de déterminer la capacité du test Osteomark® à assurer le suivi de l'effet d'un traitement par bisphosphonates sur la résorption osseuse chez les patients atteints de la maladie de Paget. Les données suivantes confirment l'utilité clinique du test Osteomark® pour le suivi de l'effet d'un traitement par bisphosphonates sur les niveaux de résorption osseuse chez les patients atteints de la maladie de Paget.

| Visite | Alendronate | Étidronate | Pamidronate |
|-----------|-------------|------------|-------------|
| Mois 1* | - 48 % | - 39 % | - 71 % |
| Mois 3** | - 77 % | - 58 % | - 67 % |
| Mois 6*** | - 87 % | - 72 % | - 71 % |

*N = 22, 17 et 20, respectivement

**N = 28, 23 et 20, respectivement

***N = 27, 22 et 20, respectivement

*Les valeurs Osteomark® doivent être contrôlées chez les patients atteints de la maladie de Paget recevant un traitement antirésorption afin de veiller à ce qu'elles correspondent à une altération ≥ 30 % des valeurs initiales ou qu'elles soient comprises dans la plage normale.

Tableau 4.

Pourcentage de personnes interrogées, tel que défini par la normalisation des marqueurs (valeur Osteomark® entre 5 et 65 nmol ECO/mmol de créatinine, phosphatase alcaline totale entre 39 et 115 UI/l ; nombre de patients dotés d'une valeur de marqueur normalisée/nombre total de patients)

| Visite* | Personnes interrogées contrôlées à l'aide d'Osteomark® | Personnes interrogées contrôlées à l'aide de la phosphatase alcaline |
|---------|--|--|
| Mois 1 | 19 % | 2 % |
| Mois 3 | 34 % | 28 % |
| Mois 6 | 42 % | 42 % |

*N = 59, 71 et 69, respectivement

- Un retour de la phosphatase alcaline totale dans sa plage normale est indicateur de réponse thérapeutique. Les valeurs Osteomark® mesurent également la réponse thérapeutique, mais elles permettent une évaluation plus précoce que la phosphatase alcaline totale.

Utilisation d'Osteomark® pour le suivi d'un traitement de suppression des œstrogènes

Un essai clinique a été réalisé afin de déterminer la capacité du test Osteomark® à assurer le suivi de l'effet d'un traitement de suppression des œstrogènes sur la résorption osseuse chez les femmes en pré-ménopause.⁶ Les résultats confirment l'utilité clinique du test Osteomark® pour le suivi de l'effet de ce type de traitement sur les niveaux de résorption osseuse.

Bibliographie

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 hydroxyllysylpyridinoline: 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.

Référence rapide pour le test urinaire Osteomark® NTx

1. Lire attentivement la procédure de test avant de commencer.
2. **Laisser les composants de la trousse et les échantillons revenir à température ambiante.**
3. Diluer le concentré de conjugué d'anticorps dans le diluant de conjugué d'anticorps selon le rapport 1:101. Mélanger doucement par retournement uniquement. Utiliser la solution de conjugué prête à l'emploi dans l'heure qui suit sa préparation.
4. À l'aide d'une pipette, déposer 25 µl de chaque étalon, contrôle et échantillon d'urine dans les micropuits indiqués.
5. À l'aide d'une pipette, déposer 200 µl de solution de conjugué prête à l'emploi dans chaque micropuits. Remuer doucement pour mélanger. Incuber la plaque à température ambiante pendant 90 mn ±5 minutes.
6. Préparer la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon pendant les 10 dernières minutes d'incubation. Diluer le réactif chromogène dans le substrat en solution tampon selon un rapport 1:101. Mélanger doucement PAR RETOURNEMENT UNIQUEMENT. **Ne pas mélanger au vortex, remuer vigoureusement ni utiliser une barre d'agitation magnétique. Utiliser la solution réactif chromogène/substrat en solution tampon dans les 30 minutes suivant la préparation.**
7. Laver les micropuits cinq (5) fois à l'aide de la solution de lavage prête à l'emploi à raison de 350 µl par puits, puis laisser sécher sur un papier absorbant.
8. Ajouter 200 µl de solution réactif chromogène/substrat en solution tampon dans chaque micropuits et incuber à température ambiante pendant 15 mn ±1 minutes.
9. Ajouter 100 µl de réactif d'immobilisation dans chaque micropuits. Remuer doucement la plaque pour mélanger.
10. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes et relever les valeurs d'absorbance de chaque micropuits à 450 nm - 630 nm. Calculer les résultats à l'aide d'une équation d'ajustement de courbe à 4 paramètres.



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

Notice d'utilisation – Français

Pour obtenir un exemplaire papier de cette notice d'utilisation, contacter votre distributeur local ou Alere.

Informations de commande et de contact

Appel gratuit depuis les États-Unis : 1-877-441-7440

Hors États-Unis : +1-321-441-7200

Service technique

Ligne d'assistance

Pour de plus amples informations, vous pouvez contacter votre distributeur local ou

le service technique Alere à l'adresse électronique ou au numéro suivant :

| | | |
|---|--------------------|-------------------------------|
| <u>États-Unis</u> | + 1 877 308 8286 | TS.SCR@alere.com |
| <u>Afrique, Russie, CEJ (Communauté des États Indépendants)</u> | +972 8 9429 683 | ARCISproductsupport@alere.com |
| <u>Asie-Pacifique</u> | +61 7 3363 7711 | APproductsupport@alere.com |
| <u>Canada</u> | +1 800 818 8335 | CANproductsupport@alere.com |
| <u>Europe et Moyen-Orient</u> | +44 161 483 9032 | EMEproductsupport@alere.com |
| <u>Amérique latine</u> | +57 01800 094 9393 | LAprductsupport@alere.com |

Test urinaire OSTEOMARK® NTx



Alere Scarborough, Inc.
10 Southgate Road
Scarborough, ME 04074 États-Unis
www.alere.com



EMERGO EUROPE, Molenstraat 15, 2513 BH
La Haye, Pays-Bas

Le logo Alere et Osteomark sont des marques commerciales du groupe Alere.
9021/DATE DE PUBLICATION : 02/11/2011 © 2011 Alere, Inc. Tous droits réservés. Imprimé aux États-Unis