

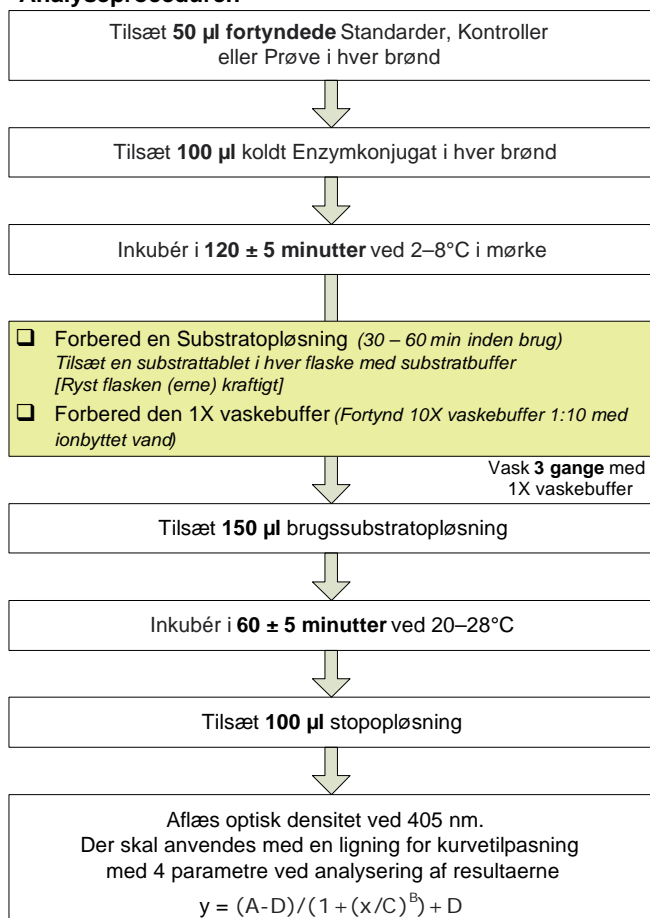
Et enzym immunoassay til kvantificering af deoxy pyridinolin (DPD)-krydsbindinger i human urin

MicroVue™ DPD EIA Opsummering

Klargøring af Reagens og Prøveeksemplar

- Forbered Enzymkonjugat med Analysebuffer; opbevar ved 2–8 °C. (7 ml koldt Analysebuffer på hvert hætteglas med enzymkonjugat.)
- Fortynd Prøver, Standarder og Kontroller 1:10 med Analysebuffer (f.eks. 50 µl Prøve + 450 µl Analysebuffer)

Analyseproceduren



TILSIGTET ANVENDELSE

MicroVue DPD er en urinalyse til kvantitativ måling af udskillelse af deoxy pyridinolin (DPD)-krydsbindinger som en indikator for knogleresorption. Forhøjede koncentrationer af DPD angiver forhøjet knogleresorption i mennesker. Målingen af DPD er beregnet som en hjælp til overvågning af knogleresorptionsforandringer i postklimakterielle kvinder, der modtager hormonbehandling eller bisfosfonat-antiresorptiv behandling og i personer med diagnosen osteoporose.

OPSUMMERING OG FORKLARING

Ca. 90% af den organiske matrix i knogler er kollagen type I, et tredobbelt helixprotein.¹ Type I kollagen fra knogler er krydsbundet af specifikke molekyler, som giver styrke og rigiditet. Krydsbindingerne i moden kollagen type 1 i knogler omfatter pyridinium-krydsbindinger, pyridinolin (PYD) og deoxy pyridinolin (DPD).^{1,2} DPD dannes ved den enzymatiske påvirkning af lisyloxidase på aminosyren lysin.³ DPD udskilles til kredsløbet under knogleresorptionsprocessen.^{2,5} DPD udskilles umetaboliseret i urinen og er upåvirket af kosten,⁶ hvilket gør det velegnet til evaluering af resorption.

Knoglerne gennemgår konstant en metabolisk proces, der kaldes remodellering.^{2,7} Processen omfatter en nedbrydningsproces, knogleresorption, der medieres af osteoclasternes aktivitet og en opbygningsproces, knogledannelsen, som medieres af osteoblasternes aktivitet.^{2,7} Remodellering er nødvendig for knoglevedligeholdelse og opretholdelse af knoglernes generelle sundhedstilstand, og foregår i tæt sammenkædede processer, således at resorption og knogledannelse er i balance.⁷ I anormale knoglemetabolismetilstande er denne proces ikke sammenkædet og – når resorptionen overskrider ossifikation – resulterer det i et nettotab af knoglemasse.⁷ Målingen af specifikke nedbrydningsprodukter af knoglematrix giver analytiske oplysninger om knoglemetabolismens hastighed.^{2,4,5}

Osteoporose er en metabolisk knoglesygdom, der er kendetegnet ved en abnorm knogleremodellering. Det er en systemisk skeletsygdom, der er karakteriseret ved lav knoglemasse og mikroarkitektonisk nedbrydning af knoglevævet med en tilhørende stigende risiko for pådragelse af fraktur.⁸ Den mest almindelige form for osteoporose forekommer i postklimakterielle kvinder som følge af den østrogenmangel, der skyldes ophøret af den ovariale funktion.⁷ Gendannelsen af det præklimakterielle østrogenniveau ved hjælp af substitutionsterapi forhindrer knoglesvind og osteoporose.⁷⁻¹⁰ Østrogen og en stofgruppe kaldet bisfosfonater er antiresorptive behandlinger til forebyggelse af tab af knoglemasse eller til behandling af osteoporose.⁷⁻¹² Osteoporose kan også skyldes, at der i opvækstårene er dannet en utilstrækkelig maksimal knoglemasse (peak bone mass), en aldersrelateret ubalance i knoglernes remodellering med en forhøjet nettoresorption, samt en række kliniske tilstande og behandlinger, som medfører knogletab eller ubalance i knoglernes remodellering.⁷ Disse omfatter endokrine lidelser, f.eks. hypogonadisme, hyperthyreoidisme, hyperparathyreoidisme, hyperkortisolisme, gastrointestinale lidelser med relation til ernærings- og mineralmetabolismen, bindevævssygdomme, multipel myeloma; kronisk immobilisering, brug af tobak eller alkohol og kronisk behandling med heparin eller binyrebarkhormoner

(kortikosteroider).⁷ Andre sygdomme, der er kendetegnet ved abnorm remodelering af knogler omfatter Paget sygdom og cancer med metastaser til knoglerne.³

Til MicroVue DPD-analysen er der anvendt antistofteknologi for at producere et monoklonalt antistof, der udviser specificitet over for DPD.¹³ Specificiteten af det monoklonale antistof, der anvendes i MicroVue DPD-analysen muliggør en enkel, hensigtsmæssig, reproducérbar og direkte kvantificering af DPD i urin.

PROCEDURENS PRINCIP

MicroVue DPD-analysen er et effektivt enzym immunoassay i mikrotiter-stripformat, der anvender et monoklonalt anti-DPD antistof, der er coated på strippen for at opsamle DPD. DPD i prøven konkurrerer med konjugeret DPD-alkalisk fosfatase om antistoffet og reaktionen påvises ved hjælp af et pNPP-substrat. MicroVue DPD-resultater justeres for urinkoncentration ved hjælp af kreatinin.

LEVEREDE MATERIALER OG REAGENSER

96 Analyser for deoxyipyridinolin-krydsbindinger

MicroVue DPD EIA-kit indeholder følgende.

A		
B	DPD Standarder A - F	Dele 4203 til 4208 0,3 ml hver
C	(A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/l DPD)	
D	DPD oprenset fra bovin knoglemasse i 10 mmol/l fosforsyre	
E	indeholdende natriumazid (0,05%) som konserveringsmiddel	
F		
L	Lave/Høje kontroller	Dele 4209, 4210 0,3 ml hver
H	DPD oprenset fra bovin knoglemasse i 10 mmol/l fosforsyre	
	indeholdende natriumazid (0,05%) som konserveringsmiddel	
1	Coatede strips	Del 4661 12 hver
	Renset murin monoklonalt anti-DPD antistof adsorberet på brøndstrips	
2	Stopopløsning	Del 4702 15 ml
	0,5N NaOH	
3	10X vaskebuffer	Del 4703 55 ml
	Nonionisk detergent i en bufferopløsning indeholdende natriumazid (0,05%) som konserveringsmiddel	
4	Analysebuffer	Del 4704 55 ml
	Nonionisk detergent i en bufferopløsning indeholdende natriumazid (0,05%) som konserveringsmiddel	
5	Substratbuffer	Del 4705 3 x 10 ml
	En diethanolamin- og magnesiumkloridopløsning indeholdende natriumazid (0,05%) som konserveringsmiddel	
6	Substrattabletter	Del 0012 3 x 20 mg
	p-Nitrophenylphosphat.	
7	Enzymkonjugat	Del 4202 3 hver
	Frysetørret DPD oprenset fra bovin knoglemasse, konjugeret til alkalisk fosfatase indeholdende buffersalte og stabilisatorer	
	Pladedæktape	Del 0047 3 hver

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDLEVEREDE MATERIALER

- Mikropipetter til afgivelse af 50–300 µl
- Egnede enheder til væskemåling af 7–300 ml
- Beholder til vaskebufferfortynding
- Glas til fortynding af prøver, standarder og kontroller
- Ionbyttet eller destilleret vand
- Pladelæser, der kan aflæse ved 405 nm
- Kalibreringskurvetilpasningssoftware med 4 parametre
- Kreatininværdier (mmol/l) for urinprøver

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Kun til *In Vitro* diagnostisk brug.
2. Prøverne skal behandles som potentielt biologisk farligt materiale. Følg gældende retningslinier for omgang med biologisk risikomateriale ved håndtering af dette kit og alle patientprøver.
3. Beholdere og ikke anvendt indhold bortskaffes i overensstemmelse med nationale, regionale og lokale bestemmelser.
4. Brug de leverede reagenser som en integreret enhed, inden udløbsdatoen på pakningens etiket.
5. Brug egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen-/ansigtssvævn ved håndtering af dette kit.
6. Opbevar analysereagenserne, som anvist.
7. Brug ikke coatede strips, hvis posen er punkteret.
8. Test hver prøve i to eksemplarer.
9. 0,5N NaOH anses for at være ætsende og kan medføre alvorlige forbrændinger. Må ikke indtages. Undgå kontakt med hud, øjne og tøj. Hvis der sker kontakt, skylles med vand. Ved indtagelse tilkaldes læge.
10. Natriumazid anvendes som konserveringsmiddel. Tilfældig kontakt med eller indtagelse af buffer indeholdende natriumazid, kan medføre irritation af hud, øjne eller mund. Brug kun bufferne til det tilsigtede formål, og undgå kontakt med syrer. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberinstallationer og danne højeksplosive metalazider. Efter bortskaffelse skylles med rigeligt vand for at undgå azidophobning.
11. Substratbufferen indeholder diethanolamin og kan forårsage irritation af øjne og/eller hud ved kontakt i længere tidsrum. Brug egnet beskyttelsestøj, handsker og øjen-/ansigtssvævn. Berørte områder skal omgående vaskes med vand og sæbe.
12. Standarder og kontroller opbevares i 10 mmol/l fosforsyre. Undgå kontakt med hud, øjne og tøj. Må ikke indtages. Hvis der sker kontakt, skylles med vand. Ved indtagelse tilkaldes læge.
13. Brug af pipetter med flere kanaler eller repeat-pipetter anbefales for at sikre rettidig tilsætning af reagenser.
14. Tilsæt prøver og standarder præcist for at sikre en nøjagtig prøveudmåling. Foretag omhyggelig afpipettering og kun ved hjælp af kalibreret udstyr.
15. Fortynd prøver større end 300 nmol/l i analysebuffer, og test igen. Inkluder fortyndingsfaktoren i den endelige beregning.
16. Denne analyse kan udføres med enhver valideret vaskemetode.

17. Deoxypyridinolin-standarder, kontroller og enzymkonjugat er lysfølsomme. Undgå at udsætte for lys gennem længere tid, især direkte eller indirekte sollys. Opbevar reagenserne mørkt, når de ikke er i brug. Prøver og reagenser påvirkes ikke væsentligt af almindelig, kunstig laboratoriebelysning, når de håndteres, som anvist i analyseproceduren.
18. Hvis der ikke kan opretholdes en stuetemperatur mellem 20–28°C, og en absorptions på > 2,0 ikke er forenelig med pladelæseren, overvåges udviklingen af substrat i standard A-brøndene; reaktionen stoppes, når den optiske densitet når 1,2–1,5; hvorefter stripsene aflæses.

KLARGØRING AF REAGENS

Vaskebuffer – se procedurebemærkningen i afsnittet ANALYSEPROCEDUREN.

Forbered den nødvendige mængde 1X vaskebuffer (se tabel i afsnittet ANALYSEPROCEDUREN) ved at fortynde 10X vaskebufferkoncentrat 1:10 med ionbyttet vand. Opbevar ved 20–28°C. Brug 1X vaskebuffer inden for 21 dage efter forberedelse.

Særlige vaskeinstruktioner. Forbered 1X vaskebuffer, som nævnt ovenfor, og opbevar ved 2–8°C, indtil brug.

Enzymkonjugat

Forbered enzymkonjugat inden for 2 timer før brugen. Rekonstituer hvert nødvendigt hætteglas med enzymkonjugat (se tabel) med 7 ml analysebuffer. Opbevar rekonstitueret enzymkonjugat ved 2–8°C indtil brug.

Brugssubstratopløsning

Substratbufferen skal være 20–28°C, inden analysen påbegyndes. (Mellem to timer og natten over anbefales). Forbered brugssubstratopløsningen inden for en time før brugen. Tilsæt en substrattablet i hver flaske med substratbuffer med temperaturen 20–28°C (se tabel). Lad tabletten (-erne) opløses i 30–60 minutter. Ryst flasken (-erne) kraftigt for at sikre fuldstændig opblanding.

OPBEVARING

Opbevar kittet ved 2–8°C.

Må ikke fryses.

Opbevar ubrugte reagenser ved 2–8°C.

PRØVEUDTAGNING- OG OPBEVARING

MicroVue DPD-analysen kan udføres ved at benytte en konserveringsmiddelfri urinprøve, der stammer fra den første eller anden morgenurin. Det anbefales, at prøverne udtages inden kl. 10:00 for at forebygge den potentielle påvirkning, som skyldes dagvariationer. Opbevar urinprøven i køleskab (2–8°C) i maks. 7 dage, eller frys prøven ved ≤ -20°C for længere opbevaring. Udsæt ikke prøven for mere end 5 fryse/optøningscykler. Undgå at udsætte for lys gennem længere tid, især sollys. Under den rutinemæssige behandling påvirkes prøverne ikke af normal, kunstig laboratoriebelysning.

Når der er tale om behandlingsovervågning, skal der indsamles baseline prøver inden behandlingen påbegyndes. Prøver til efterfølgende sammenligning skal indsamles på samme tidspunkt af dagen som baseline prøven.

ANALYSEPROCEDUREN

Læs hele indlægssedlen inden analysen startes. Se *KLARGØRING AF REAGENS*, inden du fortsætter.

PROCEDUREBEMÆRKNING: MicroVue DPD-analysen er sensitiv over for vaskeforhold. **Hele vasketrinnet skal afvikles inden for 2 minutter. Hvis vasketrinnet IKKE kan afvikles inden for 2 minutter, følges de Særlige vaskeanvisninger i afsnittene KLARGØRING AF REAGENS og Vasketrin.**

Bestem, hvor meget reagens, der skal anvendes til det antal strips, der skal anvendes.

antal strips	4	6	8	12
antal prøver (testet i to eksemplarer)	8	16	24	40
Enzymkonjugat	1	1	2*	2*
Substrat (flaske)	1	1	2*	2*
1X vaskebuffer (ml)	100	150	200	300

* Når der skal bruges mere end en flaske eller et hætteglas, skal indholdet kombineres og blandes inden brug

Inkubation af prøve-/enzymkonjugat

- Fortynd prøver, standarder og kontroller 1:10 med analysebuffer (f.eks. 50 µl prøve + 450 µl analysebuffer).
- Udtag brøndstrip-holderen og det nødvendige antal coatede strips fra posen (se tabellen). Forvis dig om, at posen, der indeholder evt. ubrugte strips, lukkes fuldstændig igen.
- Anbring det ønskede antal coatede strips i brøndstrip-holderen. Navngiv stripsene for at forhindre en sammenblanding i tilfælde af, at de utilsigtet fjernes fra brøndstrip-holderen.
- Tilsæt 50 µl fortyndet standard, kontrolvæske eller prøve i hver brønd i de coatede strips. Dette trin skal afsluttes inden for 30 minutter.
- Forbered enzymkonjugat inden for 2 timer før brugen. Rekonstituer hvert nødvendigt hætteglas med enzymkonjugat (se tabel) med 7 ml analysebuffer. Opbevar rekonstitueret enzymkonjugat ved 2–8°C indtil brug.
- Tilføj 100 µl rekonstitueret enzymkonjugat i hver brønd. Dæk stripsene til med den vedlagte dæktape. Inkuber i 2 timer (± 5 minutter) ved 2–8°C. Denne inkubation skal udføres i mørke.
- Forbered en substratopløsning inden for en time før brugen. Tilsæt en substrattablet i hver flaske med substratbuffer, der har 20–28°C (se tabel). Lad tabletten (erne) opløses i 30–60 minutter. Ryst flasken (erne) kraftigt for at sikre fuldstændig opblanding.

Vasketrin

8. Forbered den nødvendige mængde 1X vaskebuffer (se tabel) ved at fortynde 10X vaskebuffer 1:10 med ionbyttet vand. Vend manuelt op og ned/tøm stripsene. Tilsæt mindst 250 µl 1X vaskebuffer i hver brønd og vend op og ned/tøm stripsene manuelt. Gentag to gange mere, så vaskeproceduren foretages tre gange i alt. Tør stripsene grundigt med papirservietter efter den sidste vask. Mens stripsene vendes på hovedet, tørres bunden af stripsene omhyggeligt med en fnugfri papirserviet for at sikre, at bunden af stripsene er ren.

Særlige vaskeanvisninger: Udfør vasketrinnet efter ovenstående anvisninger ved hjælp af kold (2–8°C) 1X vaskebuffer. Efter sidste vask skal stripsene have lov til at dryppe af i 5–10 minutter på papirservietter, inden tilsætning af substrat.

Substratinkubation

9. Tilføj 150 µl brugssubstratopløsning i hver brønd.
10. Inkuber i 60 minutter (± 5 minutter) ved 20–28°C.

Stop/aflæs

11. Tilføj 100 µl stopopløsning i hver brønd. Tilsæt stopopløsning efter det samme mønster og tidsinterval som ved tilsætning af substratopløsning.
12. Aflæs den optiske densitet ved 405 nm. Sørg for, at der ikke findes store bobler i brøndene, og at stripsene er rene. Strips skal aflæses inden for **15 minutter** efter tilsætning af stopopløsningen.
13. Der skal anvendes kvantificeringssoftware med en ligning for kurvetilpasning med 4 parametre ved analysering af resultaterne fra MicroVue DPD-analysen.
Ligning: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
14. Bestem koncentrationen af prøver og kontroller ud fra standardkurven.
15. Kontrolværdierne skal ligge inden for det område, der er angivet i Analysecertifikatet, der leveres med kittet.

KVALITETSKONTROL

Analysecertifikatet i dette kit er lotspecifikt og skal anvendes til at bekræfte, at resultater opnået i dit laboratorium svarer til dem, der er opnået hos Quidel Corporation. De optiske densitetsværdier stilles til rådighed og skal alene anvendes som retningsgivende. Resultater opnået i dit laboratorium kan variere.

Der medleveres kvalitetskontrolintervaller. Kontrolværdierne har til formål at verificere validiteten af kurve- og prøveresultaterne. Hvert laboratorium skal etablere egne parametre for acceptable analysegrænser. Hvis kontrolværdierne IKKE ligger inden for laboratoriets acceptable grænseværdier, skal analyseresultaterne betragtes som tvivlsomme, og prøverne skal gentages.

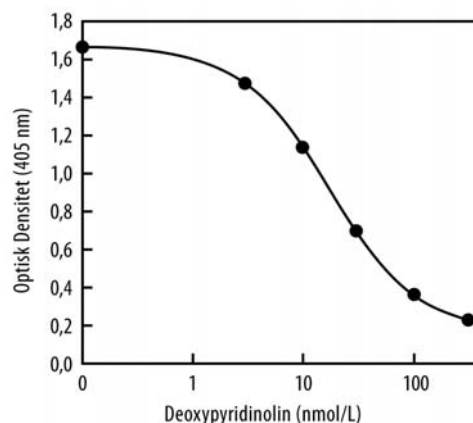
Hvis den optiske densitet for MicroVue DPD Standard A er mindre end 0,8, anses prøverne for tvivlsomme, hvorefter prøverne om muligt bør gentages.

FORTOLKNING AF RESULTATER

Resultater opnået på basis af MicroVue DPD-analysen skal korrigeres for variationer i urinkoncentrationen ved at dividere DPD-værdien (nmol/l) med kreatininværdien (mmol/l) for hver prøve (kreatinin mg/dl x 0,088 = mmol/l). De endelige MicroVue DPD-resultater vil blive udtrykt som nmol DPD/mmol kreatinin.

Repræsentativ standardkurve

DPD standardniveauer: 0, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/l



PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Selv om MicroVue DPD anvendes som en indikator for knogleresorption, er det ikke godtgjort at denne test kan forudsige udviklingen af osteoporose eller risikoen for fremtidige frakturer. Denne test er ikke godkendt til brug ved hyperparathyroidisme eller hyperthyroidisme. Når MicroVue DPD anvendes til overvågning af behandling, kan resultaterne være usikre i patienter med kliniske lidelser, der vides at påvirke knogleresorption, f.eks. knoglemetastaser tillige med de ovennævnte sygdomme og lidelser. MicroVue DPD-resultater skal fortolkes sammen med kliniske undersøgelsesresultater og andre diagnostiske resultater og bør ikke anvendes isoleret til afgørelse af, om der skal indledes behandling eller foretages ændringer i behandlingen.

PRØVEEKSEMPLAR VÆRDIER

Der er etableret referenceintervaller for MicroVue DPD for raske mænd (n = 121) og raske præklimakterielle kvinder (n = 312) over 25 år. Ved udarbejdelsen af referenceintervallerne blev normale individer defineret som:

- Grundlæggende raske individer uden knogle-, endokrine-, eller kroniske lidelser.
- Regelmæssig menstruation (kvinder)
- Ikke gravide eller ammende (kvinder)
- Individer, der ikke aktuelt indtager medicin, der vides at påvirke knoglemetabolismen (f.eks. kortikosteroider, GnRH analoger, krampestillende midler, heparin, skjoldbruskkirtelmedicin).

Værdierne kan påvirkes af faktorer som lav østrogenproduktion, lav calciumindtagelse, lavt fysisk aktivitetsniveau eller sygdomme, der vides at påvirke knoglemetabolismen, f.eks. osteoporose, Pagets sygdom, hyperparathyroidisme, hyperthyroidisme og knoglemetastaser. Østrogenmangel i postklimakterielle kvinder kan medføre forhøjet knogleresorption. Det anbefales, at det præklimakterielle referenceinterval anvendes til fortolkning af resultaterne i postklimakterielle kvinder. Hvert laboratorium bør etablere sit eget normalreferenceinterval. Intervallerne udtrykkes som nonparametriske referenceintervaller (90% CI).

	Alder (år)	Gennemsnit (nmol DPD/mmol Cr)	SD	Interval
Kvinder	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Mænd	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

Den forventelige variation inden for individet blev bestemt på basis af urinprøver fra 49 raske individer, indsamlet på fem ikke på hinanden følgende dage over en to ugers periode. Gennemsnittet for den individuelle længdevariation inden for individet var 15,5%. Variationen mellem individer er illustreret i de nonparametriske referenceintervaller, der er vist ovenstående.

PRÆSTATIONSKARAKTERISTIKA

Antistofspecifitet

Det monoklonale anti-DPD-antistof har en selektiv, høj affinitet for frit DPD og en ubetydelig binding til DPD-peptider og frie peptider eller peptid-bundet pyridinolin (PYD).

	% Reaktivitet
Frit DPD	100%
Frit PYD	< 1%
PYD/DPD-peptider	
≥ 1000 MW	< 2,5%
≥ 3500 MW	< 2,5%

Sensitivitet

Minimumsdetekteringsgrænsen for MicroVue DPD-analysen er 1,1 nmol/l, der bestemmes af den øvre 3 SD-grænse i et studie med en standard på nul.

Recovery – Spike recovery

Spike recovery blev bestemt ved at tilsætte en kendt mængde oprenset DPD i urinprøver med forskellige niveauer af endogent DPD. Typiske resultater angives herunder.

Prøve	Endogent (nmol/l)	Tilsat (nmol/l)	Observeret (nmol/l)	Recovery (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

Recovery-linearitet

Lineariteten blev bestemt ved at foretage seriel fortynding af prøver og sammenligne konstaterede værdier med forventede værdier. Typiske resultater angives herunder.

Prøve	Fortyndingsfaktor	Observeret (nmol/l)	Forventet (nmol/l)	Recovery (%)
1	ufortyndet	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	ufortyndet	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	ufortyndet	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

Præcision

Præcision inden for kørsler blev bestemt ved ≥ 21 replikater af 3 prøver på 2 plader fra hver af 3 kitlots (i alt 6 plader). Præcision mellem kørsler blev bestemt ved 3 prøver på 9 separate plader fra hver af 3 kitlots (i alt 27 plader). Prøverne vist herunder repræsenterer en række nmol/l værdier. For en kvinde med et kreatinin på 4,5 mmol/l, repræsenterer prøverne 1 til 3 henholdsvis lav normal, høj normal og forhøjet resorption (2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol og 38,8 nmol/mmol).

Prøve	DPD (nmol/l DPD)	Under kørsel ¹ CV%	Mellem kørsler ² CV%
1	10,7	8,4	4,8
2	30,0	4,3	4,6
3	174,7	5,5	3,1

¹ n = 21 ² n = 9 kørsler

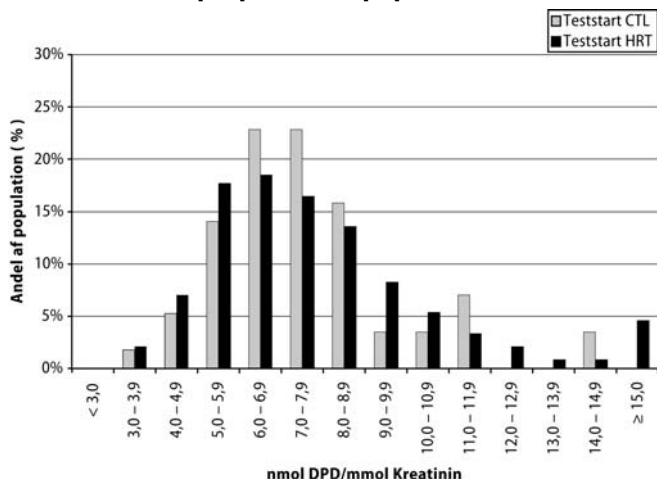
KLINISKE UNDERSØGELSER

Brug af MicroVue DPD til overvågning af anti-resorptiv hormonbehandling i postklimakterielle kvinder.

En vellykket, randomiseret, kontrolleret multicenterundersøgelse er blevet gennemført med henblik på bestemmelse af sikkerheden og effektiviteten ved brug af MicroVue DPD-analysen til overvågning af ændringer i urin-DPD-ekskretion associeret med anti-resorptiv behandling med østrogen/gestagen. Forøget knogleresorption og et signifikant tab af knoglevæv er ofte associeret med postklimakteriel østrogenmangel. Det er vist, at østrogensubstitution er effektiv til at sænke knogleresorptionen og beskytte den eksisterende knoglemasse.⁷⁻¹⁰ Testpersonerne var postklimakterielle kvinder i alderen 45 til 64 år (gennemsnit 56 ± 4 år), som havde gennemgået naturligt eller kirurgisk klimakterium inden for de sidste 10 år. Ved forsøgsstart blev egnede testdeltagere randomiseret til enten en gruppe, der modtog aktiv behandling (HRT): Premarin® (0,625 mg dagligt) med placebogestagen. Premarin® (0,625 mg dagligt) og et aktivt gestagen (Provera® 2,5 mg/dag vedvarende, Provera 10 mg/dag cyklisk eller mikroniseret progesteron 200 mg/dag cyklisk); eller til kontrolgruppen (CTL): placeboøstrogen og placebogestagen. Der blev indsamlet morgenurinprøver fra henholdsvis første og anden vandladning fra deltagerne ved undersøgelsens start samt ved 12 måneder. MicroVue DPD-resultaterne blev korigeret for kreatinin-clearance og udtrykt som nmol DPD/mmol kreatinin.

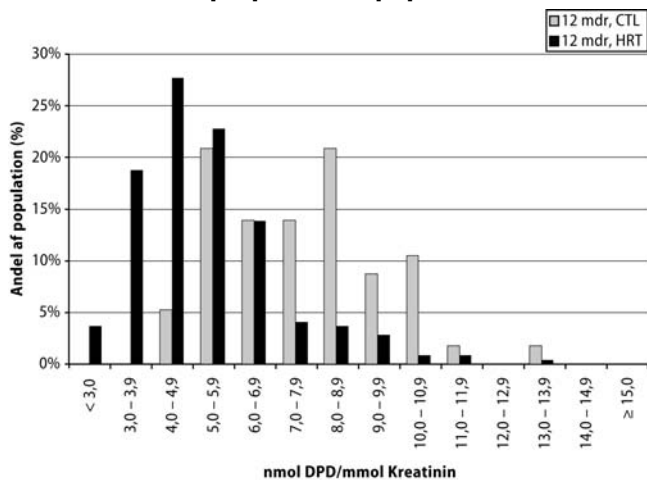
Den gennemsnitlige ($\pm 1SD$) DPD-koncentration ved undersøgelsens start ($7,56 \pm 2,27$ vs. $7,94 \pm 3,25$ U/l, $p = 0,304$) og LSBMD ($0,97 \pm 0,17$ vs. $0,97 \pm 0,15$ g/cm², $p = 0,792$) var tilsvarende for CTL og HRT. Fordelingen af DPD-værdier ved forsøgsstart for HRT og CTL er afbildet i Figur 1 efter andel af den undersøgte population.

Figur 1: Fordeling af DPD-niveauer ved forsøgsstart (som proportion af populationen)



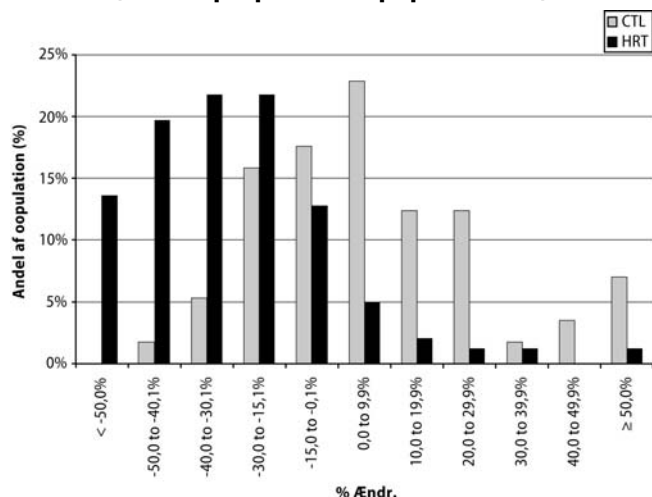
DPD var væsentligt lavere for HRT end CTL ved 12 måneder ($5,27 \pm 1,78$ vs. $8,08 \pm 3,63$ nmol/mmol, $p < 0,00001$) Ved 12 måneder havde individerne i HRT en større tendens end CTL til at have en DPD-koncentration $\leq 7,4$ nmol/mmol (89% vs. 51%, $p < 0,00001$) selvom andelen ved forsøgsstart var tilsvarende for de to grupper (CTL 56%, HRT 53%, $\leq 7,4$ nmol/mmol). Fordelingerne af DPD-værdier efter 12 måneder i HRT og CTL-grupperne er afbildet i figur 2.

Figur 2: Fordeling af DPD-koncentrationer efter 12 måneders behandling med østrogen/gestagen (HRT) eller placebo (CTL) (som en proportion af populationen)



Den gennemsnitlige (± 1 SD) DPD-koncentration i CTL-forsøgspersoner steg moderat fra forsøgsstart til $+11,7\%$ ($\pm 49,7\%$) ved 12 måneder ($p = 0,278$), hvorimod DPD-koncentrationerne i HRT-forsøgspersonerne aftog fra forsøgsstart til $-29,1$ ($\pm 23,8\%$) ved 12 måneder ($p < 0,0001$). Fordelingerne af den procentvise ændring fra forsøgsstart i DPD-værdier efter 12 måneder i HRT og CTL-grupperne er afbildet i figur 3.

Figur 3: Fordeling af den procentvise ændring i DPD-koncentrationer efter 12 måneders behandling med østrogen/gestagen (HRT) eller placebo (CTL) (som en proportion af populationen)



Ved 12 måneder havde deltagerne i HRT-gruppen øget knoglemasse-tætheden i lænderyggen (LSBMD) sammenlignet med CTL ($p < 0,00001$), som vist i tabel 1:

Tabel 1. Ændringer i LSBMD (gennemsnit \pm SD)

	n	Forsøgsstart (g/cm ²)	12 måneder (g/cm ²)	Δ (%)
CTL	57	$0,97 \pm 0,17$	$0,95 \pm 0,17$	$-1,6 \pm 2,7$
HRT	244	$0,97 \pm 0,15$	$1,01 \pm 0,15$	$+3,7 \pm 2,7$

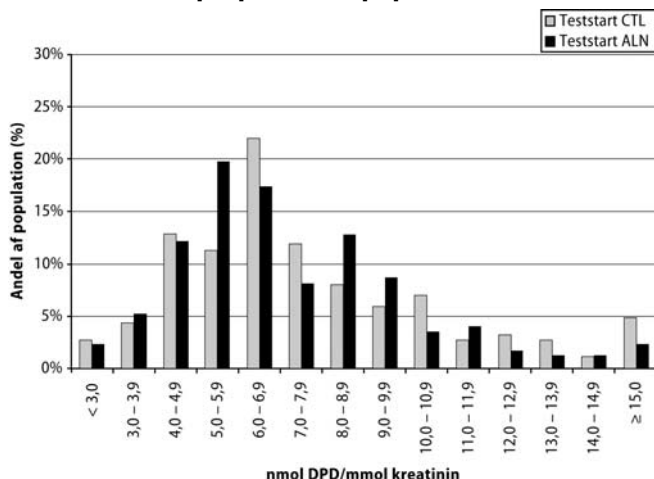
Disse resultater antyder, at MicroVue DPD-analysen er sikker og effektiv til overvågning af den antiresorptive effekt af hormonsubstitutionsbehandling af postklimakterielle kvinder.

Brug af MicroVue DPD til overvågning af bisfosfonat antiresorptiv hormonbehandling ved osteoporose.

En vellykket, randomiseret, kontrolleret multicenterundersøgelse er blevet gennemført med henblik på bestemmelse af sikkerheden og effektiviteten ved brug af MicroVue DPD-analysen til overvågning af ændringer i udskillelsen af DPD i urinen i forbindelse med antiresorptiv behandling med aminobisfosfonat (alendronat). Testpersonerne var postklimakterielle kvinder i alderen 45 til 84 år (gennemsnit 64 ± 7 år) med diagnosen osteoporosis (baseret på klinisk forekomst eller en knoglemineraldensitet i columna lumbalis [LSBMD] ved forsøgsstart, der lå mere end 2,5 standardafvigelser under gennemsnittet for modne præklimakterielle kvinder). Ved forsøgsstart blev de egnede testdeltagere randomiseret til at modtage enten 10 mg alendronat og 500 mg calcium pr. dag (ALN) eller 500 mg calcium pr. dag (CTL). Der blev indsamlet morgenuurinprøver fra den anden morgenvandladning fra deltagerne ved undersøgelsens start samt efter 3, 6 og 12 måneder. MicroVue DPD-resultater blev korrigeret for kreatinin-clearance og udtrykt som nmol DPD/mmol kreatinin.

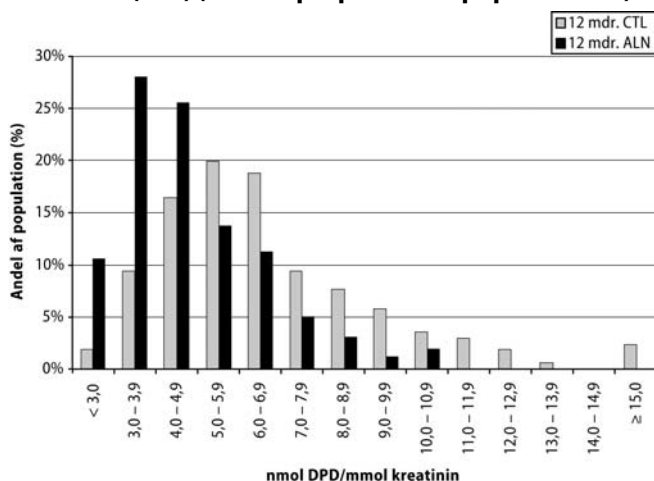
Den gennemsnitlige (± 1 SD) DPD-koncentration ved undersøgelsens start ($7,35 \pm 3,30$ vs. $7,74 \pm 3,47$ U/l, $p = 0,278$) og LSBMD ($0,75 \pm 0,09$ vs. $0,74 \pm 0,10$ g/cm², $p = 0,426$) var tilsvarende for ALN og CTL. Fordelingen af DPD-værdier ved forsøgsstart i ALN og CTL er afbildet i figur 4 efter andel af den undersøgte population.

Figur 4: Fordeling af DPD-niveauer ved forsøgsstart (som proportion af populationen)



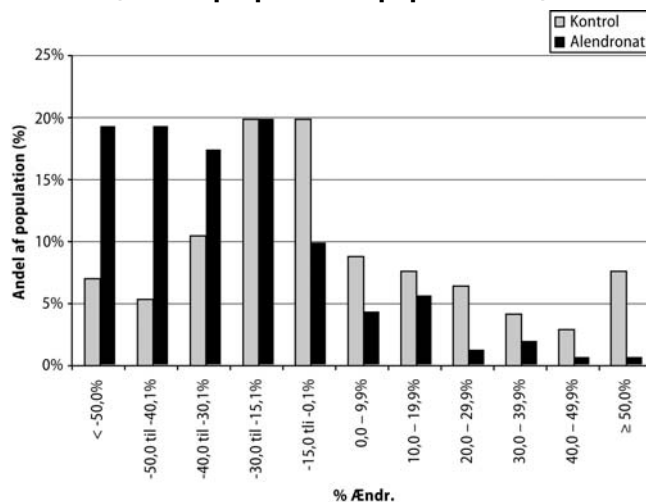
DPD var væsentligt lavere for ALN end CTL ved 3 ($5,45 \pm 2,61$ vs. $7,56 \pm 3,08$ nmol/mmol, $p < 0,00001$), 6 ($4,83 \pm 1,94$ vs. $7,09 \pm 3,33$ nmol/mmol, $p < 0,00001$), og 12 måneder ($4,78 \pm 1,75$ vs. $6,73 \pm 2,98$ nmol/mmol, $p < 0,00001$). Ved henholdsvis 3, 6 og 12 måneder, havde 84, 89, og 91%, af ALN-testpersonerne en DPD-koncentration på $\leq 7,4$ nmol/mmol. Individene i ALN havde en større tendens end CTL-forsøgspersonerne til at have en DPD-koncentration $\leq 7,4$ nmol/mmol ved alle tidsintervallerne, selvom andelen ved forsøgsstart var tilsvarende for de to grupper (CTL 60,4%, ALN 57,8%, $\leq 7,4$ nmol/mmol). Fordelingerne af DPD-værdier efter 12 måneder i ALN og CTL-grupperne er afbildet i figur 5.

Figur 5: Fordelingen af DPD-koncentrationer efter 12 måneders behandling med alendronat (ALN) eller kalcium (CTL) (som en proportion af populationen)



Den gennemsnitlige ($\pm 1SD$) DPD-koncentration i CTL-forsøgsgruppen faldt gradvist fra forsøgsstart til - 4,9% ($\pm 34,9\%$) ved 12 måneder ($p = 0,003$), hvilket muligvis afspejler den beskedne knogle-sparende effekt for kalcium.¹⁵ De gennemsnitlige DPD-koncentrationer i ALN-forsøgspersonerne aftog $22,9 \pm 37,4\%$ ved 3 måneder, $28,6 \pm 25,8\%$ ved 6 måneder og $29,5 \pm 26,7\%$ ved 12 måneder. Fordelingerne af den procentvise ændring fra forsøgsstart i DPD-værdier efter 12 måneder i ALN- og CTL-grupperne er afbildet i figur 6.

Figur 6: Fordelingen af den procentvise ændring af DPD-koncentrationer efter 12 måneders behandling med alendronat (ALN) eller kalcium (CTL) (som en proportion af populationen)



Ved 12 måneder havde deltagerne i ALN-gruppen øget LSBMD sammenlignet med CTL ($p < 0,00001$), som vist i tabel 2:

Tabel 2. Ændringer i LSBMD (gennemsnit \pm SD)

	n	Forsøgsstart (g/cm ²)	12 måneder (g/cm ²)	Δ (%)
CTL	167	$0,75 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,09$	$-0,8 \pm 3,3$
ALN	156	$0,74 \pm 0,09$	$0,78 \pm 0,10$	$+5,7 \pm 4,2$

Disse resultater antyder, at MicroVue DPD-analysen er sikker og effektiv til overvågning af den antiresorptive effekt af amino-bisfosfonat (alendronat) i personer med diagnosen osteoporose.

Supplerende undersøgelser

Der blev udført kliniske undersøgelser for at evaluere deoxy pyridinolin-koncentrationerne i urin ved hjælp af MicroVue DPD-analysen sammenholdt med de koncentrationer, man var nået frem til ved hjælp af HPLC-analyse¹⁴ og klinisk diagnose.

Den første af disse undersøgelser blev udført ved kliniske undersøgelsescentre under anvendelse af 54 prøver fra raske frivillige og 140 prøver fra patienter med kendte knogledidelser (herunder osteoporose, Pagets sygdom, hyperparathyroidisme og hyperthyroidisme). Disse sygdomme involverer ofte forhøjet knogleresorption, og denne gruppe testpersoner blev betragtet som en risikogruppe. Men ikke alle deltagerne forventedes at have forhøjet knogleresorption på prøveindsamlingsstidspunktet. 103 af de 140 patienter diagnosticeret med en lidelse havde ikke forhøjede pyridinolin-værdier i henhold til HPLC-målingen. MicroVue DPD-deoxy pyridinolin-værdierne i raske deltagere lå i intervallet mellem 2,3 til 11,2 nmol/mmol og i patienter lå det i intervallet fra 1,2 til 37,3 nmol/mmol.

I undersøgelsen blev MicroVue DPD-analysen sammenlignet med en HPLC-forskningsmetode¹⁴ til måling af pyridinolin. Tærskelværdien for HPLC blev i en undersøgelse med deltagelse af 84 raske individer bestemt til at være 50 nmol/mmol for mænd og 60 nmol/mmol for kvinder (95% konfidensinterval som øvre grænse for begge køn). Ved hjælp af forhøjet pyridinolin, der blev bestemt ved hjælp af HPLC, som klassifikationsmetode, anvendtes ROC-kurver til at definere en optimal relativ sensitivitet og specificitet i den beskrevne population. Relativ sensitivitet og specificitet er angivet i tabel 3. En to gange to kontingenstabel, der angiver antallet af individer i hver klassifikation er vist i figur 7.

Tabel 3
MicroVue DPD

Relativ sensitivitet	69%
Specificitet	87%

Figur 7

		HPLC	
		Forhøjet +	Ikke forhøjet -
MicroVue DPD	+	31	20
	-	14	129

I den anden undersøgelse sammenlignedes MicroVue DPD-analyseresultaterne i en blandet population på 39 prøver fra raske individer og 69 prøver fra patienter med Pagets sygdom. Selvom Pagets sygdom repræsenterer en model til identificering af aktiv knogleresorption, var nogle af patienterne i denne undersøgelse i behandling eller blev muligvis anset for at være i bedring uden at have forhøjet knogleresorption på prøveindsamlingsstidspunktet. I denne undersøgelse varierede værdierne for raske deltagere fra 2,3 til 6,4 nmol/mmol Patienter med Pagets sygdom varierede fra 1,7 til 50,4 nmol/mmol

Ved hjælp af diagnosen Pagets sygdom som klassifikationsmetode, anvendtes ROC-kurver til at definere en optimal relativ sensitivitet og specificitet i denne population. Relativ sensitivitet og specificitet angives i tabel 4. En to gange to kontingenstabel vises i figur 8.

Tabel 4
MicroVue DPD

Relativ sensitivitet	91%
Specificitet	97%

Figur 8
Pagets sygdom

		Pagets sygdom	
		Ja	Nej
MicroVue DPD	+	63	1
	-	6	38

ASSISTANCE

For serviceydelser uden for USA kontaktes den lokale distributør. Yderligere information om Quidel, vores produkter og vore distributører kan findes på www.quidel.com.

Covered by U.S. Patent Nos. 5,620,861, 5,7000,694, 6,121,002, og 5,283,197.

REFERENCER

1. Seyedin SM, Rosen DM. Matrix Proteins of the Skeleton. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1990;2:914-919.
2. Delmas PD. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In: Riggs BL, Melton LJ,III (eds): *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995, pp. 319-333.
3. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Urinary pyridinium crosslinks of collagen. Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol.Metab.* 1992;3:263-270.
4. Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E, Riis B, Christiansen C. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 1991;6:639-644.
5. Eastell R, Colwell A, Hampton L, Reeve J. Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 1997;12:59-65.
6. Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur.J.Clin.Invest.* 1993;23:341-349.
7. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West.J.Med.* 1991;154:63-77.
8. Consensus Development Statement. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporosis Int.* 1997;7:1-6.
9. Bush TL, Wells HB, James MK, Barrett-Connor E, Marcus R, Greendale G, Hunsberger S, McGowan J. Effects of Hormone Therapy on Bone Mineral Density: Results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. *J.Am.Med.Assoc.* 1996;276(17):1389-1396.
10. Hesley RP, Shepard KA, Jenkins DK, Riggs BL. Monitoring estrogen replacement therapy and identifying rapid bone losers with an immunoassay for deoxypyridinoline. *Osteoporosis Int.* 1998;8:159-164.
11. Chesnut CH,III, McClung MR, Ensrud KE, et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: Effect of multiple dosages on bone mass and bone remodeling. *Am.J.Med.* 1995;99:144-152.
12. Devogelaer JP, Broll H, Correa-Rotter R, et al. Oral alendronate induces progressive increases in bone mass of the spine, hip, and total body over 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 1996;18:141-150.
13. Robins SP, Woitge H, Hesley R, Ju J, Seyedin S, Seibel MJ. Direct enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 1994;9:1643-1649.
14. Pratt DA, Daniloff Y, Duncan A, Robins SP. Automated analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in tissue and urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 1992;207:168-175.
15. Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SJ. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Am.J.Med.* 1995;98:331-335.
16. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

GLASSET



Se brugsanvisninger CDROM



Tilsigtet anvendelse

REF 8007 – **MICROVUE** Bone Health DPD EIA Kit



QUIDEL[®]
CORPORATION
SPECIALTY PRODUCTS

RESEARCH TO RAPIDS™

Quidel Corporation | 10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA | www.quidel.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany