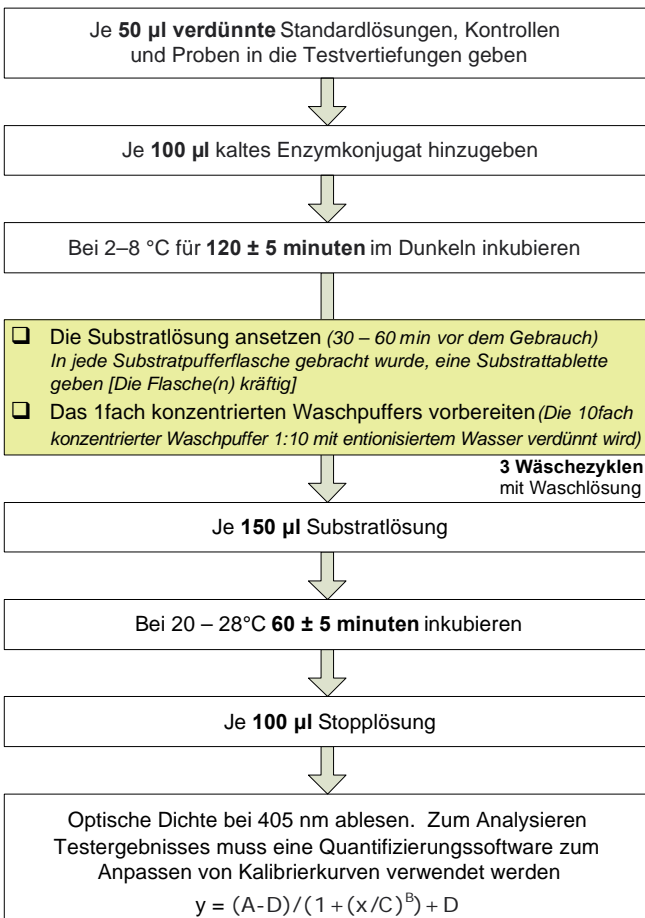


MicroVue™ DPD EIA Zusammenfassung

Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- Das Enzymkonjugat innerhalb mit Testpufferlösung; Bei 2–8 °C aufbewahren. (7 ml kalter Testpufferlösung für jedes Fläschchen des Enzymkonjugats)
- Die Standardlösungen, Kontrollen und Urinproben 1:10 mit Testpufferlösung verdünnen (50 µl Probe + 450 µl Testpufferlösung)

Testverfahren



VERWENDUNGSZWECK

MicroVue DPD ist ein Urin-test, mit dem die Ausscheidung von Deoxypyridinolin-(DPD)-Crosslinks - ein Indikator der Knochenresorption - quantitativ bestimmt werden kann. Eine erhöhte DPD-Konzentration im Urin zeigt eine vermehrte Knochenresorption an. Mit der Bestimmung von DPD wird das Ziel verfolgt, bei postmenopausalen Frauen, die antiresorptive Hormon- oder Bisphosphonattherapien erhalten und bei Patienten mit diagnostizierter Osteoporose die Überwachung von Knochenresorptionsänderungen zu unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Ungefähr 90 % der organischen Knochenmatrix besteht aus Kollagen vom Typ I, ein Protein in Form einer Tripelhelix.¹ Das Typ-I-Kollagen ist im Knochen mit einer Reihe spezifischer Moleküle vernetzt, die ihm eine gewisse Steifigkeit und Festigkeit verleihen. Bei den Crosslinks in Typ-I-Kollagen des Knochens handelt es sich um Pyridinium-Crosslinks, Pyridinolin (PYD) und Deoxypyridinolin (DPD).^{1,2} DPD wird durch die enzymatische Wirkung der Lysyloxidase auf die Aminosäure Lysin gebildet.³ In die Zirkulation freigesetzt wird DPD bei der Knochenresorption.²⁻⁵ Da DPD im nicht metabolisierten Zustand mit dem Urin ausgeschieden wird und nicht ernährungsabhängig⁶ ist, ist es ein geeigneter Marker für die Bewertung der Resorption.

Knochen unterliegen einem als Knochengewebere-modellierung bezeichneten und kontinuierlich stattfindenden Stoffwechselfvorgang.^{2,7} Dazu gehören ein Abbauvorgang - eine durch Osteoklasten bewirkte Knochenresorption - und ein Aufbauvorgang, die durch Osteoblasten bewirkte Knochenformation.^{2,7} Die Remodellierung ist zum Erhalt der Gesamtintegrität des Knochens erforderlich und beruht auf einer genau abgestimmten Kopplung, d.h. Resorptions- und Formationsvorgänge stehen in einem Gleichgewicht zueinander.⁷ Bei einer Störung des Knochenstoffwechsels tritt dieser Prozess aus dem Gleichgewichtszustand heraus, so dass es bei einem Übergewicht an Resorption gegenüber Formationsvorgängen zu einem Gesamtverlust an Knochenmatrix kommt.⁷ Durch die Bestimmung spezifischer Abbauprodukte der Knochenmatrix werden analytische Daten über die Geschwindigkeit des Knochenstoffwechsels erhalten.^{2,4,5}

Osteoporose ist eine Knochenstoffwechselkrankheit, die durch Störungen der Knochengewebere-modellierung charakterisiert ist. Es ist eine systemische Skeletterkrankung, die von einer geringen Knochenmasse und einem mikrostrukturellen Abbau des Knochengewebes begleitet ist und somit zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt.⁸ Der häufigste Typ der Osteoporose tritt bei postmenopausalen Frauen auf und wird von einem auf dem Ausbleiben der Ovarialfunktion beruhenden Östrogenmangel verursacht.⁷ Durch die Wiederherstellung der prämenopausalen Östrogenkonzentration mittels Substitutionstherapien kann ein Abbau des Knochengewebes und Osteoporose verhindert werden.⁷⁻¹⁰ Auf Östrogenen und den sog. Bisphosphonaten beruhende antiresorptive Therapien können zur Vermeidung von Knochenschwund oder zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden.⁷⁻¹² Zudem kann Osteoporose ein Resultat einer inadäquaten maximalen Knochenmasse während der Wachstumsperiode sein - einem altersbedingten Ungleichgewicht der Knochengewebere-modellierung, bei dem die Resorption

übermäßig stark ausgeprägt ist - und durch eine Reihe klinischer Erkrankungen und Therapien verursacht worden sein, die zu Knochenschwund oder Störungen der Knochengeweberemodellierung führen.⁷ Dazu gehören endokrine Erkrankungen wie z. B. Hypogonadismus, Hyperthyreose, Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, ernährungsbedingte und auf dem Mineralstoffwechsel beruhende Gastrointestinalerkrankungen, Bindegewebskrankheiten, multiple Myelome, chronische Immobilisation, Alkoholismus, Tabakmissbrauch sowie chronische Heparin- und Kortikosteroidtherapien.³ Andere für eine gestörte Knochengeweberemodellierung charakteristische Erkrankungen sind die Paget-Krankheit und Knochenmetastasen.³

Für den MicroVue DPD Assay wurde mit Hilfe der Antikörpertechnologie ein monoklonaler Antikörper mit einer hohen DPD-Spezifität entwickelt.¹³ Diese Spezifität des monoklonalen Antikörpers ermöglicht es, die DPD-Aktivität in Urin auf einfache, bequeme, reproduzierbare und direkte Weise zu bestimmen.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue DPD Assay ist ein auf Mikrotiterstreifen beruhender, kompetitiver Enzym-Immunoassay, bei dem DPD an die mit einem monoklonalen Anti-DPD-Antikörper beschichteten Teststreifen gebunden wird. Das in der Probe vorliegende DPD konkurriert mit der alkalischen DPD-Phosphatase um den Antikörper und die Reaktion wird mit Hilfe eines p-NPP-Substrats erfasst. Die mit dem MicroVue DPD Assay erhaltenen Ergebnisse sind für Urinkonzentrationen von Creatinin korrigiert.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Tests auf Deoxyypyridinolin-Crosslinks

Der MicroVue DPD Enzym-Immunoassay enthält folgende Komponenten:

- | | | | |
|----------|---|--------------------------|-----------|
| A | | | |
| B | DPD-Standardlösungen A – F | Artikelnr. 4203 bis 4208 | je 0,3 ml |
| C | (A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/l DPD) | | |
| D | Von Rinderknochen isoliertes DPD in 10 mmol/l Phosphorsäure | | |
| E | und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel | | |
| F | | | |
| L | Niedrige/Hohe Kontrolle | Artikelnr. 4209, 4210 | je 0,3 ml |
| H | Von Rinderknochen isoliertes DPD in 10 mmol/l Phosphorsäure | | |
| | und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel | | |
| 1 | Beschichtete Teststreifen | Artikelnr. 4661 | je 12 |
| | Gereinigter Monoklonaler Anti-DPD-Antikörper von Mäusen | | |
| | absorbiert auf die Vertiefungen der Teststreifen | | |
| 2 | Stopplösung | Artikelnr. 4702 | 15 ml |
| | 0,5 N NaOH | | |
| 3 | 10fach konzentrierter Waschpuffer | Artikelnr. 4703 | 55 ml |
| | Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid | | |
| | (0,05 %) als Konservierungsmittel | | |
| 4 | Testpufferlösung | Artikelnr. 4704 | 55 ml |
| | Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid | | |
| | (0,05 %) als Konservierungsmittel | | |
| 5 | Substratpuffer | Artikelnr. 4705 | 3 x 10 ml |
| | Eine Lösung aus Diethanolamin und Magnesiumchlorid mit | | |
| | Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel | | |

- | | | | |
|----------|---|-----------------|-----------|
| 6 | Substrattabletten | Artikelnr. 0012 | 3 x 20 mg |
| | p-Nitrophenylphosphat | | |
| 7 | Enzymkonjugat | Artikelnr. 4202 | je 3 |
| | Von Rinderknochen isoliertes, lyophilisiertes DPD im Konjugat mit | | |
| | alkalischer Phosphatase. Enthält Puffersalze und Stabilisatoren | | |
| | Plättchenklebeabdeckung | Artikelnr. 0047 | je 3 |

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Mikropipetten zum Pipettieren von 50–300 µl
- Geräte zum Abmessen von Flüssigkeiten im Volumenbereich von 7 bis 300 ml
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Röhrchen zum Verdünnen von Proben, Standardlösungen und Kontrollen
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Plattenlesegerät für Absorbanzmessungen bei 405 nm
- Software zum Anpassen von Kalibrierkurven (4 Parameter)
- Creatininwerte (mmol/l) für Urinproben

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zur *In-vitro*-Diagnostik
2. Alle Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
3. Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
4. Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
5. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen beim Arbeiten mit diesem Kit.
6. Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
7. Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
8. Jede Probe mit Duplikaten testen.
9. 0,5 N NaOH ist ätzend und kann zu schweren Verbrennungen führen. Nicht einnehmen. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.
10. Natriumazid wird als Konservierungsstoff verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen, die Natriumazid enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Pufferlösungen nur für die vorgesehenen Verwendungszwecke einsetzen und den Kontakt mit Säuren vermeiden. Natriumazid kann beim Kontakt mit Kupfer- und Bleirohren hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen, um eine Anreicherung von Aziden zu vermeiden.
11. Der Substratpuffer enthält 2,2'-Imino-diethanol und kann bei anhaltendem Kontakt Reizungen der Augen und/oder der Haut verursachen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Betroffene Bereiche nach dem Kontakt sofort mit Wasser und Seife waschen.

12. Standardlösungen und Kontrollen liegen in 10 mmol/l Phosphorsäure vor. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Nicht einnehmen. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.
13. Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanalpipetten empfohlen.
14. Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
15. Proben mit über 300 nmol/l mit Testpufferlösung verdünnen und erneut bestimmen. Den Verdünnungsfaktor bei den Berechnungen berücksichtigen.
16. Für dieses Assay kann eine beliebige anerkannte Waschmethode eingesetzt werden.
17. Die Deoxy pyridinolin-Standardlösungen, Kontrollen und Enzymkonjugate sind lichtempfindlich. Eine länger anhaltende Bestrahlung mit Licht, besonders mit direktem Licht oder indirekte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden. Die Reagenzien bei Nichtgebrauch im Dunkeln aufbewahren. Die Proben und Reagenzien werden durch normale, künstliche Laborbeleuchtung nicht signifikant beeinträchtigt, vorausgesetzt, die unter *TESTVERFAHREN* gegebenen Hinweise werden berücksichtigt.
18. Wenn die Raumtemperatur nicht auf 20–28 °C gehalten werden und eine Absorbanz > 2,0 nicht mit Ihrem Plattenlesegerät gemessen werden kann, den Reaktionsverlauf des Substrats in den Vertiefungen mit Standardlösung A verfolgen. Die Reaktion stoppen, wenn die Absorbanz Werte im Bereich von 1,2-1,5 erreicht. Dann die Ergebnisse der Teststreifen ablesen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschpuffer – siehe Verfahrenshinweise unter *TESTVERFAHREN*.

Das benötigte Volumen des 1fach konzentrierten Waschpuffers (siehe Tabelle unter *TESTVERFAHREN*) vorbereiten, indem 10fach konzentrierter Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Bei 20–28 °C aufbewahren. Den 1fach konzentrierten Waschpuffer innerhalb von 21 Tage nach dem Ansetzen verwenden.

Besondere Waschanleitungen: Den 1fach konzentrierten Waschpuffer wie oben beschrieben ansetzen und bei 2–8 °C bis zum Gebrauch aufbewahren.

Enzymkonjugat

Das Enzymkonjugat innerhalb von 2 Stunden vor Gebrauch ansetzen. Alle benötigten Fläschchen des Enzymkonjugats (siehe Tabelle) mit 7 ml Testpufferlösung anrühren. Das so angesetzte Enzymkonjugat bis zum Gebrauch bei 2–8 °C aufbewahren.

Substratlösung

Der Substratpuffer muss vor dem Test auf 20–28 °C gebracht werden (zwei Stunden bis über Nacht wird empfohlen). Die Substratlösung innerhalb 1 Stunde vor dem Gebrauch ansetzen. In jede benötigte Substratpufferflasche (siehe Tabelle), die auf 20–28 °C gebracht wurde,

eine Substrat-tablette geben. Die Tablette(n) 30-60 Minuten auflösen lassen. Die Flasche(n) kräftig schütteln, um eine vollständige Auflösung zu erzielen.

LAGERUNG

Das Kit bei 2–8 °C aufbewahren.

Nicht einfrieren.

Nicht benutzte Reagenzien bei 2–8 °C aufbewahren.

ENTNAHME UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Der MicroVue DPD Assay kann mit nicht konserviertem erstem oder zweitem Morgenurin durchgeführt werden. Um den Einfluss potenzieller diurnaler Schwankungen auszuschließen, sollte die Probenahme vor 10.00 Uhr erfolgen. Die Urinprobe bis zu 7 Tage gekühlt (2–8 °C) aufbewahren, darüber hinaus die Probe bei ≤ –20 °C einfrieren. Die Proben dürfen nicht häufiger als fünfmal eingefroren/aufgetaut werden. Eine länger anhaltende Bestrahlung mit Licht, besonders mit Sonnenlicht ist zu vermeiden. Bei normaler Behandlung werden die Proben nicht durch die normale, künstliche Laborbeleuchtung beeinträchtigt.

Die Ausgangsproben (Basislinie) bei der Therapiekontrolle vor dem Start der Behandlung nehmen. Alle weiteren Verlaufspuren zur gleichen Tageszeit nehmen wie die Ausgangsproben.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Vor dem Fortfahren die unter VORBEREITUNG DER REAGENZIEN gegebenen Informationen einsehen.

VERFAHRENSHINWEISE: Der MicroVue DPD Assay ist von den Waschbedingungen abhängig. Der **gesamte Waschschrift** sollte **innerhalb von 2 Minuten** abgeschlossen werden. **Wenn der Waschschrift NICHT innerhalb von 2 Minuten beendet werden kann, die unter VORBEREITUNG DER REAGENZIEN und Waschen gegebenen besonderen Waschanleitungen befolgen.**

Die Volumina der verschiedenen Reagenzien bestimmen, die für eine bestimmte Anzahl von Teststreifen benötigt werden.

Anz. der Teststreifen	4	6	8	12
Anz. der Proben (Bestimmung in Duplikaten)	8	16	24	40
Enzymkonjugat (Fläschchen)	1	1	2*	2*
Substrat (Flasche)	1	1	2*	2*
1fach-Waschpuffer (ml)	100	150	200	300

* Werden mehrere Flaschen oder Fläschchen benötigt, deren Inhalt zusammenschütten und vor dem Gebrauch mischen.

Inkubation der Probe / des Enzymkonjugats

1. Die Proben, Standardlösungen und Kontrollen im Verhältnis 1:10 mit Testpufferlösung verdünnen (z. B. 50 µl Probe + 450 µl Testpufferlösung).
2. Den Teststreifenträger und die benötigte Anzahl der beschichteten Teststreifen aus dem Beutel nehmen (siehe Tabelle). Darauf achten, dass der Beutel, sofern er ungenutzte Teststreifen enthält, wieder richtig verschlossen wird.

3. Die gewünschte Anzahl der beschichteten Teststreifen in den Teststreifenhalter legen. Die Teststreifen beschriften, damit sie nicht vertauscht werden können, sollte der Teststreifenträger unbeabsichtigt entfernt werden.
4. 50 µl verdünnte Standardlösung, Kontrolle oder Probe in alle Vertiefungen der beschichteten Teststreifen geben. Dieser Schritt sollte innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen werden.
5. Das Enzymkonjugat innerhalb von 2 Stunden vor Gebrauch ansetzen. Alle benötigten Fläschchen des Enzymkonjugats (siehe Tabelle) mit 7 ml Testpufferlösung anrühren. Die so angesetzten Enzymkonjugate bis zum Gebrauch bei 2–8 °C aufbewahren.
6. 100 µl des wiederhergestellten Enzymkonjugats in jede Vertiefung geben. Die Teststreifen mit dem beiliegenden Verschlussstreifen abdecken. Bei 2–8 °C 2 Stunden (± 5 Minuten) inkubieren. Diese Inkubation sollte im Dunkeln erfolgen.
7. Die Substratlösung innerhalb 1 Stunde vor dem Gebrauch ansetzen. In jede benötigte Substratpufferflasche (siehe Tabelle), die auf 20–28 °C gebracht wurde, eine Substratablette geben. Die Tablette(n) 30–60 Minuten auflösen lassen. Die Flasche(n) kräftig schütteln, um eine vollständige Auflösung zu erzielen.

Waschen

8. Das benötigte Volumen des 1fach konzentrierten Waschpuffers (siehe Tabelle) vorbereiten, indem 10fach konzentrierter Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Die Teststreifen manuell umdrehen/entleeren. Mindestens 250 µl des 1fach konzentrierten Waschpuffers in jede Vertiefung geben und die Teststreifen manuell umdrehen/entleeren. Diesen Vorgang zweimal wiederholen, um insgesamt dreimal zu waschen. Die Teststreifen nach dem letzten Waschschrift durch kräftiges Ausschlagen auf ein Papierhandtuch trocknen. Die umgekehrten Teststreifen unten mit einem fusselreifen Papierhandtuch vorsichtig abwischen, um sicherzustellen, dass die Unterseite der Teststreifen sauber ist.
Besondere Waschanleitungen: Den Waschschrift wie oben beschrieben mit kaltem (2–8 °C), 1fach konzentriertem Waschpuffer durchführen. Die Teststreifen nach dem letzten Waschschrift 5–10 Minuten auf Papierhandtüchern abtropfen lassen, bevor das Substrat zugegeben wird.

Inkubieren des Substrats

9. 150 µl der Substratlösung in jede Vertiefung geben.
10. Bei 20–28 °C 60 Minuten (± 5 Minuten) inkubieren.

Hinzugeben der Stopplösung und Ablesen des Ergebnisses

11. 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung sollte auf die gleiche Weise und mit dem gleichen zeitlichen Ablauf erfolgen wie die Zugabe der Substratlösung.
12. Die Absorbanz bei 405 nm ablesen. Darauf achten, dass sich in den Vertiefungen keine größeren Blasen befinden und dass die Unterseite der Teststreifen sauber ist. Die Ergebnisse sollten innerhalb von **15 Minuten** nach der Zugabe der Stopplösung abgelesen werden.

13. Zum Analysieren des MicroVue DPD Testergebnisses muss eine Quantifizierungssoftware zum Anpassen von Kalibrierkurven (4 Parameter) verwendet werden. Gleichung: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
14. Die Konzentration der Proben und der Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
15. Die Kontrollwerte sollten innerhalb des Bereichs liegen, der im beiliegenden Analysezertifikat angegeben ist.

QUALITÄTSKONTROLLE

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist nicht spezifischer Natur und soll nachweisen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen der Quidel Corporation entsprechen. Die gegebenen Absorbanzwerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor erhaltenen Ergebnisse können davon abweichen.

Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Probenergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien festlegen, nach denen die Testergebnisse anzunehmen sind. Wenn die Kontrollwerte nicht innerhalb der zulässigen Grenzwerte Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden.

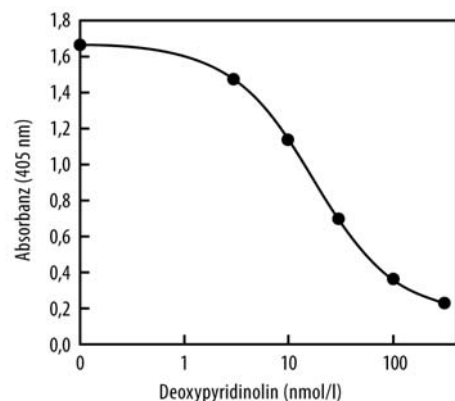
Wenn die Absorbanz der MicroVue DPD Standardlösung A unter 0,8 liegt, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben sofern möglich wiederholt werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die mit dem MicroVue DPD Assay erhaltenen Ergebnisse müssen für Schwankungen der Urinkonzentration korrigiert werden, indem der DPD-Wert (nmol/l) jeder Probe durch den Creatininwert (mmol/l) dividiert wird (Creatinin mg/dl x 0,088 = mmol/l). Die endgültigen MicroVue DPD-Ergebnisse werden als „nmol DPD/mmol Creatinin“ angegeben.

Repräsentative Standardkurve

DPD-Konzentration der Standardlösungen: 0, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/l



GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue DPD Assay dient zwar als Indikator für die Knochenresorption, der Einsatz dieses Tests zum Prognostizieren des Osteoporoseverlaufs oder des zukünftigen Frakturrisikos ist jedoch nicht vorgesehen. Der Einsatz dieses Tests für Hyperparathyreoidismus oder

Hyperthyreose wurde noch nicht untersucht. Nicht eindeutige Ergebnisse sind beim Einsatz des MicroVue DPD Assays für die Therapiekontrolle bei Patienten zu erwarten, die an Knochenresorption beeinflussenden Krankheiten leiden, wie z. B. Knochenmetastasen. Dies ist zusätzlich zu den oben aufgeführten Krankheiten zu berücksichtigen. Die Ergebnisse des MicroVue DPD Assays sollten im Zusammenhang mit anderen klinischen Daten und den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren ausgewertet werden und sollten nicht als einzige Entscheidungsgrundlage für den Start oder die Änderung einer Therapie herangezogen werden.

REFERENZBEREICHE

Die Referenzbereiche des MicroVue DPD Assays wurden für gesunde Männer (n = 121) und gesunde prämenopausale Frauen (n = 312) über 25 Jahren festgelegt. Für die Bestimmung der Referenzbereiche wurden gesunde Probanden wie folgt definiert:

- Grundsätzlich gesund, ohne endokrine oder chronische Erkrankungen bzw. Knochenerkrankungen
- Regelmäßiger Menstruationszyklus (Frauen)
- Keine schwangeren oder stillenden Frauen
- Keine Medikationen, von denen bekannt ist, dass sie den Knochenstoffwechsel beeinflussen (z. B. Kortikosteroide, GnRH-Analoga, Antikonvulsiva, Heparin, Schilddrüsen-Medikationen)

Beeinflusst werden die Werte durch Faktoren wie eine geringe Östrogenproduktion, geringe Kalziumaufnahme, geringe physische Aktivität und Krankheiten, von denen bekannt ist, dass sie den Knochenstoffwechsel beeinflussen wie z. B. Osteoporose, Paget-Krankheit, Hyperparathyroidismus, Hyperthyreose und Knochenmetastasen. Ein bei postmenopausalen Frauen auftretender Östrogenmangel kann zu einer erhöhten Knochenresorption führen. Bei postmenopausalen Frauen sollte zum Auswerten der Ergebnisse der prämenopausale Referenzbereich herangezogen werden. Jedes Labor sollte einen eigenen normalen Referenzbereich festlegen. Die Bereiche sollten in Form von nicht parametrischen Referenzintervallen (90 % KI) angegeben werden.

	Alter (Jahre)	Mittel (nmol DPD/mmol Cr)	SA	Bereich
Frauen	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Männer	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

Die zu erwartende intraindividuelle Variabilität wurde auf der Grundlage von Urinproben ermittelt, die über zwei Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen von 49 gesunden Probanden genommen wurden. Die mittlere intraindividuelle Variabilität betrug 15,5 %. Die interindividuelle Variabilität spiegelt sich in den oben gegebenen, nicht parametrischen Referenzintervallen wider.

LEISTUNGSMERKMALE

Antikörperspezifität

Der monoklonale Anti-DPD-Antikörper zeigt eine hohe Selektivität und Affinität für freies DPD. Die Bindungsaffinität für DPD-Peptide sowie freies und Peptidgebundenes Pyridinolin (PYD) ist vernachlässigbar gering.

	% Reaktivität
Freies DPD	100 %
Freies PYD	< 1 %
PYD/DPD-Peptide	
≥ 1000 MG	< 2,5 %
≥ 3500 MG	< 2,5 %

Sensitivität

Die Nachweisgrenze des MicroVue DPD Assays beträgt 1,1 nmol/l und wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

Wiedergewinnung – maximale Wiedergewinnung

Die maximale Wiedergewinnung (engl. „spike recovery“) wurde dadurch ermittelt, dass eine bekannte Menge gereinigtes DPD zu Serumproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von endogenem DPD hinzugegeben wurde. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Probe	Endogen (nmol/l)	Zugabe (nmol/l)	Gefunden (nmol/l)	Wiedergew (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

Wiedergewinnung – Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem eine serielle Verdünnungsreihe der Proben erstellt wurde und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Probe	Verdünnung	Gefunden (nmol/l)	Erwartet (nmol/l)	Wiedergew (%)
1	unverdünnt	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	unverdünnt	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	unverdünnt	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

Präzision

Die Präzision „in der Serie“ wurde für ≥ 21 Replikate von 3 Proben auf 2 Plättchen von 3 verschiedenen Kitchargen (insgesamt 6 Plättchen) ermittelt. Die Präzision „von Serie zu Serie“ wurde durch die Bestimmung von 3 Proben auf 9 einzelnen Plättchen von 3 verschiedenen Kitchargen (insgesamt 27 Plättchen) ermittelt. Die Proben waren für den unten beschriebenen Konzentrationsbereich repräsentativ. Die Proben 1 bis 3 einer Frau mit einer Creatininkonzentration von 4,5 mmol/l stellen die Resorptionsbereiche niedrig-normal, hoch-normal, und erhöht dar (2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol und 38,8 nmol/mmol).

Probe	DPD (nmol/L DPD)	In der Serie ¹ (CV %)	Von Serie zu Serie 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 serien

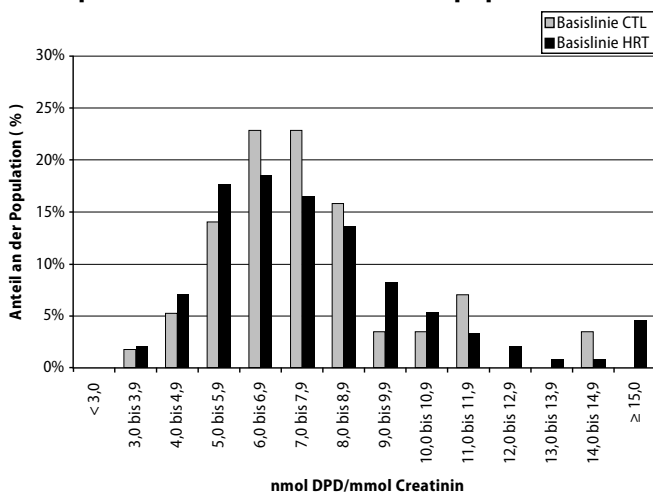
KLINISCHE STUDIEN

Kontrolle anti-resorptiver Hormontherapien bei postmenopausalen Frauen mit dem MicroVue DPD Assay

Zur Bestimmung der Zuverlässigkeit und Wirksamkeit des MicroVue DPD Assays für die Überwachung von Änderungen der DPD-Konzentrationen in Urin, die bei anti-resorptiven Östrogen-/Progesterin-Therapien auftreten, wurde eine randomisierte, kontrollierte Multizenterstudie durchgeführt. Ein postmenopausaler Östrogenmangel geht häufig mit einer erhöhten Knochenresorption und einem signifikanten Knochenabbau einher. Es wurde gezeigt, dass durch eine Östrogenersatztherapie die Knochenresorption wirksam gesenkt und die vorhandene Knochenmasse erhalten werden kann.⁷⁻¹⁰ Bei den Probanden handelte es sich um postmenopausale Frauen im Alter zwischen 45 und 64 Jahren (Mittelwert 56 ± 4 Jahre) mit natürlicher oder chirurgischer Menopause in den letzten 10 Jahren. Die geeigneten Probanden wurden an der Basislinie randomisiert und entweder einer aktiven Behandlungsgruppe (HRT) (Premarin® [0,625 mg täglich] mit Placebo-Progesterin, Provera® 2,5 mg/Tag und aktivem Progesterin [Provera® 2,5 mg/Tag und kontinuierlich, Provera 10 mg/Tag zyklisch oder mikronisiertes Progesteron 200 mg/Tag zyklisch] oder der Kontrollgruppe (CTL) (Placebo-Östrogen und Placebo-Progesterin) zugewiesen. Die Proben des ersten und zweiten Morgenurins wurden von allen Probanden zum Ausgangszeitpunkt (Basislinie) und nach 12 Monaten entnommen. Die für die Creatinin-Clearance korrigierten Ergebnisse des MicroVue DPD Assays werden als „nmol DPD/mmol Creatinin“ angegeben.

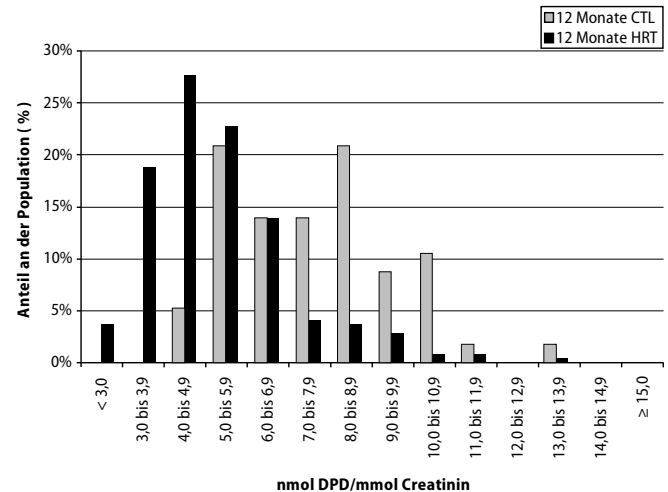
Die mittlere (± 1 SA) DPD-Basislinienkonzentration ($7,56 \pm 2,27$ vs. $7,94 \pm 3,25$ nmol/mmol, $p = 0,304$) und LSBMD ($0,97 \pm 0,17$ vs. $0,97 \pm 0,15$ g/cm², $p = 0,792$) waren in der HRT- und CTL-Gruppe ähnlich. In Abb. 1 ist die Verteilung der DPD-Basislinienwerte in der HRT- und CTL-Gruppe als prozentualer Anteil der Studienpopulation dargestellt.

Abb. 1: Verteilung der DPD-Werte (Basislinie) als prozentualer Anteil der Studienpopulation



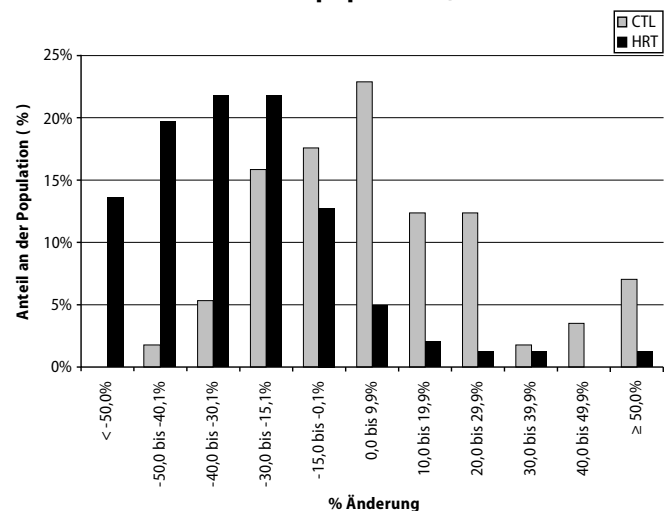
Die DPD-Werte waren in der HRT-Gruppe nach 12 Monaten signifikant niedriger als in der CTL-Gruppe ($5,27 \pm 1,78$ vs. $8,08 \pm 3,63$ nmol/mmol, $p < 0,00001$). In den Probanden der HRT-Gruppe war die Wahrscheinlichkeit, DPD-Konzentrationen $\leq 7,4$ nmol/mmol aufzufinden, nach 12 Monaten höher als in der CTL-Gruppe (89 % vs. 51 %, $p < 0,00001$) trotz vergleichbarer Ausgangszustände (CTL 56 %, HRT 53 %, $\leq 7,4$ nmol/mmol). In Abb. 2 ist die Verteilung der DPD-Werte in der HRT- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

Abb. 2: Verteilung der DPD-Werte nach 12 Monaten Therapie mit Östrogen/Progesterin (HRT) oder Placebo (CTL) (als prozentualer Anteil der Studienpopulation)



Die mittlere (± 1 SA) DPD-Konzentration nahm in den Probanden der CTL-Gruppe nach 12 Monaten von der Basislinie etwas auf $+11,7$ % ($\pm 49,7$ %) zu ($p = 0,278$), wogegen die DPD-Konzentrationen in den Probanden der HRT-Gruppe im gleichen Zeitraum von der Basislinie auf $-29,1$ ($\pm 23,8$ %) abnahm ($p < 0,0001$). In Abb. 3 ist die Verteilung der prozentualen DPD-Änderungen von der Basislinie in der HRT- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

Abb. 3: Verteilung der prozentualen DPD-Änderung nach 12 Monaten Therapie mit Östrogen/Progesterin (HRT) oder Placebo (CTL) (als prozentualer Anteil der Studienpopulation)



Wie in Tabelle 1 dargestellt, trat bei den Probanden der HRT-Gruppe im Vergleich zur CTL-Gruppe nach 12 Monaten eine LSBMD-Zunahme auf ($p < 0,00001$).

Tabelle 1. LSBMD-Änderungen (Mittelwert \pm SA)

	n	Basislinie (g/cm ²)	12 Monate (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

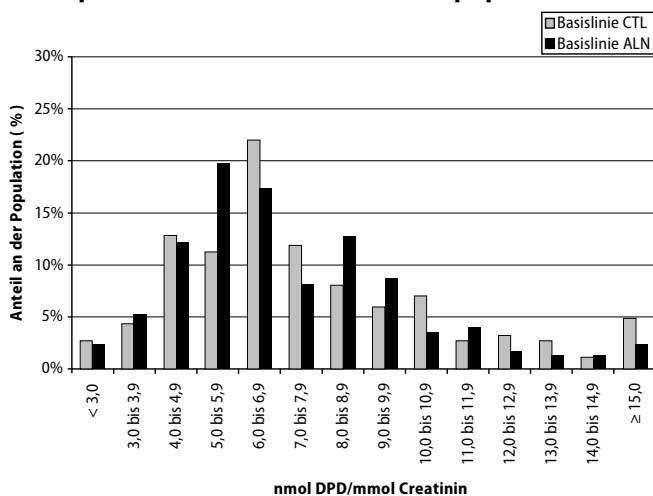
Diese Ergebnisse zeigen, dass der MicroVue DPD Assay zur Überwachung der antiresorptiven Wirkung von Hormonersatztherapien bei postmenopausalen Frauen zuverlässig und wirksam ist.

Kontrolle antiresorptiver Bisphosphonattherapien bei Osteoporose mit dem MicroVue DPD Assay

Zur Bestimmung der Zuverlässigkeit und Wirksamkeit des MicroVue DPD Assays bei der Überwachung von Änderungen der DPD-Konzentrationen in Urin, die bei antiresorptiven Bisphosphonat-(Alendronat)-Therapien auftreten, wurde eine randomisierte, kontrollierte Multizenterstudie durchgeführt. Die Probanden waren postmenopausale Frauen im Alter zwischen 45 und 84 Jahren (Mittel 64 ± 7 Jahre), bei denen Osteoporose diagnostiziert wurde (beruhend auf der klinischen oder Basislinien-Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule [LSBMD], über 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert für reife, prämenopausale Frauen). Die geeigneten Probanden wurden an der Basislinie randomisiert und erhielten entweder 10 mg Alendronat und 500 mg Kalzium täglich (ALN) oder 500 mg Kalzium täglich (CTL). Die Proben des zweiten Morgenurins wurden von allen Probanden an der Basislinie sowie nach 3, 6 und 12 Monaten genommen. Die für die Creatinin-Clearance korrigierten Ergebnisse des MicroVue DPD Assays werden als „nmol DPD/mmol Creatinin“ angegeben.

Die mittlere (± 1 SA) DPD-Basislinienkonzentration ($7,35 \pm 3,30$ vs. $7,74 \pm 3,47$ nmol/mmol, $p = 0,278$) und LSBMD ($0,75 \pm 0,09$ vs. $0,74 \pm 0,10$ g/cm², $p = 0,426$) waren in der ALN- und CTL-Gruppe ähnlich. In Abb. 4 ist die Verteilung der DPD-Basislinienwerte in der ALN- und CTL-Gruppe als prozentualer Anteil der Studienpopulation dargestellt.

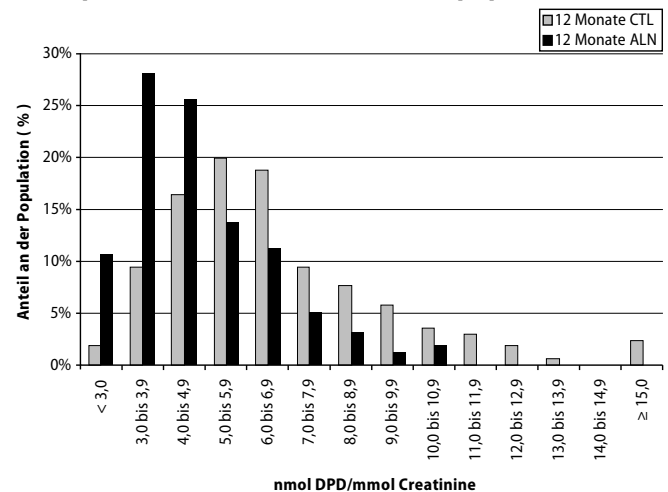
Abb. 4: Verteilung der DPD-Werte (Basislinie) als prozentualer Anteil der Studienpopulation



Nach 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, $p < 0,00001$) und 12 Monaten ($4,78 \pm 1,75$ vs.

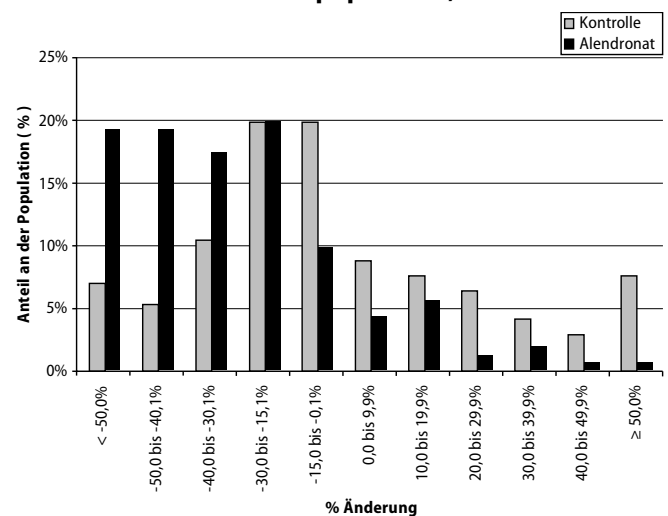
$6,73 \pm 2,98$ nmol/mmol, $p < 0,00001$) waren die DPD-Werte in der ALN-Gruppe im Vergleich zur CTL-Gruppe signifikant niedriger. Nach 3, 6 und 12 Monaten wurden bei jeweils 84, 98 und 91 % der ALN-Probanden DPD-Konzentrationen $\leq 7,4$ nmol/mmol nachgewiesen. In den Probanden der ALN-Gruppe war trotz vergleichbarer Ausgangszustände beider Gruppen (CTL 60,4 %, ALN 57,8 %, $\leq 7,4$ nmol/mmol) die Wahrscheinlichkeit, DPD-Konzentrationen $\leq 7,4$ nmol/mmol aufzufinden, zu allen Zeitpunkten ($p = 0,002$) höher als in der CTL-Gruppe. In Abb. 5 ist die Verteilung der DPD-Werte in der ALN- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

Abb. 5: Verteilung der DPD-Werte nach 12 Monaten Therapie mit Alendronat (ALN) oder Kalzium (CTL) als prozentualer Anteil der Studienpopulation



Die mittlere (± 1 SA) DPD-Konzentration nahm in den Probanden der CTL-Gruppe nach 12 Monaten von der Basislinie auf $-4,9$ % ($\pm 34,9$ %) ab ($p = 0,003$), was auf die knochenerhaltende Wirkung von Kalzium zurückzuführen ist.¹⁵ Die mittlere DPD-Konzentration nahm in den Probanden der ALN-Gruppe nach 3 Monaten um $22,9 \pm 37,4$ %, nach 6 Monaten um $28,6 \pm 25,8$ % und nach 12 Monaten um $29,5 \pm 26,7$ % ab. In Abb. 6 ist die Verteilung der prozentualen DPD-Änderungen von der Basislinie in der ALN- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

Abb. 6: Verteilung der prozentualen DPD-Änderungen nach 12 Monaten Therapie mit Alendronat (ALN) oder Kalzium (CTL) als prozentualer Anteil der Studienpopulation



Wie in Tabelle 2 dargestellt, trat bei den Probanden der ALN-Gruppe im Vergleich zur CTL-Gruppe nach 12 Monaten eine LSBMD-Zunahme auf ($p < 0,00001$).

Tabelle 2. LSBMD-Änderungen (Mittelwert \pm SA)

	n	Basislinie (g/cm ²)	12 Monate (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

Diese Ergebnisse zeigen, dass der MicroVue DPD Assay zur Überwachung der antiresorptiven Wirkung von Aminobisphosphonat-(Alendronat-)-Therapien bei Probanden mit diagnostizierter Osteoporose zuverlässig und wirksam ist.

Weitere Studien

Es wurden klinische Studien durchgeführt, um die mit dem MicroVue DPD Assay bestimmten Deoxyypyridinolin-Konzentrationen in Urin mit denen im Rahmen von HPLC-Analysen¹⁴ gefundenen zu vergleichen. Gleichzeitig sollten diese Daten mit den klinischen Diagnosen in Zusammenhang gebracht werden.

Die erste dieser Studien wurden an verschiedenen klinischen Forschungseinrichtungen mit 54 Proben von gesunden Freiwilligen und 140 Proben von Patienten mit diagnostizierten Knochenkrankheiten (Osteoporose, Paget-Krankheit, Hyperparathyroidismus, Hyperthyreose) durchgeführt. Diese Krankheiten werden häufig von einer erhöhten Knochenresorption begleitet. Bei dieser Gruppe handelte es sich um eine Risikopopulation. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass nicht bei allen Probanden zum Zeitpunkt der Probenahme eine erhöhte Knochenresorption vorlag. Bei 103 der 140 Patienten mit diagnostizierten Krankheiten wurden mittels HPLC keine erhöhten Pyridinolinwerte gefunden. Die mit dem MicroVue DPD Assay gefundenen Deoxyypyridinolinwerte lagen bei den gesunden Probanden im Bereich von 2,3 bis 11,2 nmol/mmol und bei den Patienten im Bereich von 1,2 bis 37,3 nmol/mmol.

Im Rahmen der Studie wurde der MicroVue DPD Assay mit einer zu Forschungszwecken eingerichteten HPLC-Methode¹⁴ für die Bestimmung von Pyridinolin verglichen. Der HPLC-Grenzwert lag – bestimmt in einer Studie mit 84 gesunden Probanden – bei 50 nmol/mmol für Männer und 60 nmol/mmol für Frauen (geschlechtsspezifischer oberer Grenzwert mit einem Konfidenzintervall von 95 %). Mit Hilfe der ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics) wurde für die beschriebene Population eine optimale relative Sensitivität und Spezifität festgelegt. Dabei wurden die erhöhten, mittels HPLC bestimmten Pyridinolinwerte als Klassifizierungsmethode zugrunde gelegt. Die relative Sensitivität und Spezifität sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Anzahl der Probanden pro Klassifizierung ist in einer 2x2-Kontingenztafel in Abb. 7 veranschaulicht.

Tabelle 3

MicroVue DPD	
Relative Sensitivität	69 %
Spezifität	87 %

Abb. 7

		HPLC erhöht +	Pyridinolin nicht erhöht -
MicroVue DPD	+	31	20
	-	14	129

In der zweiten Studie wurden die Ergebnisse des MicroVue DPD Assays in einer gemischten Population verglichen, die aus 39 Proben von gesunden Probanden und 69 Proben von Patienten mit der Paget-Krankheit bestand. Zwar stellt die Paget-Krankheit ein Modell für die Identifizierung aktiver Knochenresorption dar, einige an dieser Studie teilnehmende Patienten befanden sich jedoch in Behandlung oder zeigten Remissionszeichen und hatten zum Zeitpunkt der Probenahme u. U. keine erhöhte Knochenresorption. Bei den gesunden Probanden wurden in dieser Studie Werte zwischen 2,3 und 6,4 nmol/mmol und bei Patienten der Paget-Krankheit 1,7 und 50,4 nmol/mmol gefunden.

Mit Hilfe der ROC-Analyse wurde für diese Population eine optimale relative Sensitivität und Spezifität festgelegt. Dabei wurde die Diagnose der Paget-Krankheit als Klassifizierungsmethode zugrunde gelegt. Die relative Sensitivität und Spezifität sind in Tabelle 4 aufgeführt. Abb. 8 zeigt eine 2x2-Kontingenztafel.

Tabelle 4

MicroVue DPD	
Relative Sensitivität	91 %
Spezifität	97 %

Abb. 8

		Diagnostizierte Paget-Krankheit	
		Ja	Nein
MicroVue DPD	+	63	1
	-	6	38

KUNDENDIENST

Informationen zum Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort. Zusätzliche Informationen zu Quidel, unseren Produkten und Vertretungen finden Sie auf unserer Website www.quidel.com.

Unterliegt folgenden US-Patenten: 5,620,861, 5,700,694, 6,121,002, und 5,283,197.

LITERATURVERWEISE

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.

GLOSSAR



Gebrauchsanweisung beachten auf CDROM



Verwendungszweck

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

 **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